

Estudio genético clínico y molecular de epilepsias familiares

Nombre del doctorando:

Eva Gutiérrez Delicado

Licenciatura del doctorando:

Licenciatura en Medicina y Cirugía

Director de tesis:

José M^a Serratosa Fernández.

Lugar de realización de tesis:

Fundación Jiménez Díaz (Madrid).



Don José M^a Serratosa Fernández, Doctor en Medicina y Cirugía, jefe del Servicio de Neurología de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

CERTIFICA:

Que Doña Eva Gutiérrez Delicado ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “Estudio genético clínico y molecular de epilepsias familiares”.

Revisado el presente trabajo, considero que tiene la debida calidad para su defensa y calificación.

En Madrid, a 3 de Julio de 2012

Fdo: Dr. José M^a Serratosa Fernández

La genética es la clave de nuestro origen y de nuestra evolución

A mi familia

GRACIAS

Este trabajo es el resultado de años de “excursiones” a otras ciudades y pueblos para entrevistar a familias y pedirles muestras de su sangre para estudios genéticos. Es el resultado de tardes buscando información en libros, artículos e internet. También de horas de reflexión frente a estos artículos, con mis compañeros de laboratorio e incluso con mis padres. En resumen, es el resultado de investigar, de “curiosear” profundamente con el fin de encontrar explicación a las cosas.

La oportunidad de poder realizar esta tarea tan entretenida, emocionante y “viciosa” se la debo al Dr. José María Serratosa, que ha sabido crear el caldo de cultivo necesario. Muchas gracias.

Agradezco también a las familias que han participado en esta tesis y han colaborado en el resto de estudios realizados en el laboratorio. Gracias por su generosidad y por los recuerdos que me han dejado. No solo me han dado una información muy valiosa y me han abierto sus puertas, sino que también me han ayudado a conseguir las muestras en algún caso de forma clandestina, me han regalado un libro y hasta unas zapatillas de estar por casa.

Muchas gracias a los doctores Juan Gómez Alonso, Manuel García y Manuel Seijo, por brindarnos la oportunidad de poder estudiar a las familias incluidas en esta tesis.

Muchas gracias a la Dra. Pilar Gómez-Garré, Piluca, que ha sido mi compañera y amiga durante estos años, me ha ayudado a entender muchas cosas, entre ellas lo importante que es tener otro punto de vista y lo esencial que es integrar la información clínica y básica en investigación.

También agradezco a todos los compañeros del laboratorio y de la unidad de Epilepsia con los que compartí esos años; Laura Sáez, Jose Morales Corraliza, Cristina Gómez Abad y Vicente Villanueva, por el ambiente que tuvimos y por todo lo que me aportaron con su trabajo. También a los que se han incorporado más tarde; Rosa Guerrero y Beatriz González Giraldez por ayudarme a completar información y contenidos de esta tesis. Muchas gracias.

Muchas gracias a mis acompañantes de viajes: A mi tía Emma y a mi madre en Francia, a Alvaro Vela en Galicia, a Jorge en la Rioja y a Piluca en Córdoba y en la Mancha. Me ayudasteis mucho y lo pasamos muy bien!

Agradezco a mis padres, además de leer y corregir pacientemente este trabajo, cómo nos han educado a mi y a mis hermanos. La educación es la mejor herencia. Muchas gracias por transmitirnos la curiosidad y el interés por explorar hasta el último camino, por ser optimistas y no cansarnos de aprender. Muchísimas gracias.

Muchas gracias a Jorge, por comprenderme y respetarme tal como soy. Por darme tiempo para escribir esta tesis ratito a ratito y por ayudarme con algunas fotos y figuras. También por disfrutar conmigo tantos momentos, por “dejarte liar” y por supuesto, por compartir tus genes conmigo.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Terminología y clasificación	21
1.1.1. Definiciones	21
1.1.2. Clasificación de las crisis epilépticas y de las epilepsias	22
1.2. Genética de las epilepsias	25
1.2.1. Generalidades	25
1.2.2. Genética de las epilepsias idiopáticas generalizadas	26
1.2.3. Genética de las epilepsias familiares	28
1.2.3.1. Epilepsia generalizada con crisis febriles plus (GEFS+)	28
1.2.3.1.1. Canal de sodio	29
1.2.3.1.1.1. Subunidad beta 1 (<i>SCN1B</i>)	29
1.2.3.1.1.2. Subunidad alfa 1 (<i>SCN1A</i>)	29
1.2.3.1.1.3. Subunidad alfa 2 (<i>SCN2A</i>)	31
1.2.4. Genética de las malformaciones corticales	33
1.2.4.1. Heterotopia nodular periventricular	33
1.2.5. Genética de las epilepsias asociadas a enfermedades mitocondriales	36
1.2.5.1. Características clínicas de las enfermedades mitocondriales	36
1.2.5.2. Modo de herencia de los trastornos mitocondriales	37
1.2.5.3. Epilepsia asociada a trastornos mitocondriales	38
1.2.5.3.1. Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS)	38
1.2.5.3.2. Epilepsia mioclónica con fibras musculares rojo rasgadas (MERRF)	39

2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Estudio genético clínico	47
3.1.1. Selección de familias	47
3.1.2. Historia familiar y construcción del árbol genealógico	47
3.1.3. Fenotipaje clínico de los individuos afectados	49
3.1.4. Estudio cardiológico de la familia EIG-24	50
3.2. Estudio genético molecular	51
3.2.1. Recogida de muestras	51
3.2.2. Extracción del ADN	51
3.2.3. Amplificación del ADN mediante PCR	52
3.2.4. Secuenciación del ADN	53
3.2.5. Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)	54
3.2.6. Análisis de polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas del ADN (SSCPs)	55
3.2.7. Análisis de microsatélites	56
3.2.8. Análisis de ligamiento	56
4. RESULTADOS	
4.1. Familia AAE	61
4.1.1. Análisis clínico	61
4.1.1.1. Características del árbol genealógico	61
4.1.1.2. Características clínicas y fenotipo de los pacientes	61
4.1.2. Análisis molecular	77

4.2. Familia EIG-24	79
4.2.1. Análisis clínico	79
4.2.1.1. Características del árbol genealógico	79
4.2.1.2. Características clínicas y fenotipo de los pacientes	79
4.2.1.3. Estudio cardiológico	91
4.2.1.4. Pruebas complementarias	92
4.2.2. Análisis molecular	94
4.2.3. Estudio electrofisiológico	96
4.3. Familia ED-HP	97
4.3.1. Análisis clínico	97
4.3.1.1. Características del árbol genealógico	97
4.3.1.2. Características clínicas y fenotipo de los pacientes	98
4.3.2. Análisis genético	102
5. DISCUSIÓN	
5.1. Familia AAE	107
5.1.1. Aspectos clínicos	107
5.1.2. Aspectos genéticos	115
5.2. Familia EIG-24	118
5.2.1. Aspectos clínicos	118
5.2.2. Aspectos genéticos	126
5.3. Familia ED-HP	128
5.3.1. Aspectos clínicos	128
5.3.2. Aspectos genéticos	131

6. CONCLUSIONES	137
7. BIBLIOGRAFÍA	141
8. ABREVIATURAS	157
9. PUBLICACIONES	

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCION

Tabla 1. Clasificación Internacional de las crisis epilépticas (<i>ILAE, 1981</i>)	23
Tabla 2. Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos (<i>ILAE, 1989</i>)	24
Tabla 3. Genes implicados en las epilepsias idiopáticas generalizadas	27
Tabla 4. Epilepsias familiares en las que se han localizado genes	32
Figura 1. Esquema de la estructura de la filamina	35
Tabla 5. Genes asociados a epilepsias mitocondriales	40

MATERIAL Y METODOS

Figura 2. Símbolos comúnmente utilizados en el diseño del pedigree	48
Figura 3. Esquema básico de construcción de un pedigree	48
Tabla 6. Técnicas de genética molecular empleadas en el estudio de cada familia	58

RESULTADOS

FAMILIA AAE

Figura 4. Esquema del pedigree	63
Figura 5a y 5b. Individuo III-7. EEG interictal	66
Figura 5c. Individuo III-7. EEG ictal	66
Fig 6. Individuo III-2. EEG interictal	71
Fig 7. Individuo III-2. EEG ictal	72
Tabla 7. Características clínicas de los pacientes	75
Figura 8. Análisis de la mutación 5793A>G: a. probando (III-7) y b.padre sano de la probando (II-5)	78
Fig 9. Análisis RFLP	79

FAMILIA EIG-24

Figura 10. Esquema del pedigree	87
Tabla 8. Características clínicas de los pacientes	89
Tabla 9. Resultados del estudio cardiológico	91
Figura 11a. Individuo III-11. Descarga generalizada de punta-onda irregular	92
Figura 11b. Individuo III-11. EEG interictal. Puntas focales independientes sobre ambas regiones temporales.	93

Figura 12. Individuo II-13 (probando). Descarga generalizada de punta-onda Irregular	93
Figura 13. Análisis de secuenciación: a.paciente y b. individuo control	95
Figura 14. Esquema de la estructura proteica de la subunidad alfa del canal de sodio cerebral y localización de la mutación N1735K	95
Figura 15. Resultados del estudio electrofisiológico	96
FAMILIA ED-HNP	
Figura 16. Árbol genealógico de la familia ED-HNP	97
Tabla 10. Características clínicas de los pacientes pertenecientes a la familia ED-HNP	100
Figura 17. Hiperlaxitud articular en individuos II-2 (a) y III-2 (b y c)	101
Figura 18. Resonancia magnética cerebral (RM) y tomografía computarizada (TC) mostrando la heterotopia nodular periventricular (HNP). Imágenes de RM correspondientes a los pacientes II-2 (a), III-2 (b) y IV-1 (c). TC sin contraste en el paciente III-2 (d)	101
Figura 19. Estudio ultraestructural de una biopsia de piel en la probando (a) y en un individuo control (b)	101
Figura 20. Mutación de <i>FLNA</i> 98	103
Figura 21. Análisis RFLP	103
Figura 22. Estructura del gen de la filamina A. Localización de la mutación c.383C>T	104

RESUMEN

Esta tesis está dirigida al estudio de epilepsias familiares. La búsqueda y caracterización clínica de estas familias ha sido una herramienta fundamental en la investigación en genética de las epilepsias. Aunque la mayoría de las epilepsias presentan una herencia compleja, una minoría de familias presenta una herencia monogénica o en la que existe un gen dominante. Es el estudio de estas familias lo que ha permitido mediante el análisis de ligamiento con marcadores genéticos la identificación de genes implicados en las distintas formas de epilepsia. La mayoría de estos genes codifican subunidades de canales iónicos y de receptores de neurotransmisores implicados en la excitabilidad neuronal. El efecto de las mutaciones en estos genes es habitualmente un cambio en las propiedades dinámicas del canal iónico/receptor y en ocasiones en la expresión de estas proteínas en la membrana neuronal, cambios que conducen a la hiperexcitabilidad neuronal y a las crisis.

De todas las familias identificadas en nuestro laboratorio (más de 50) he escogido tres de especial interés que son las que desarrollaré a lo largo de este trabajo. Estas familias son:

Familia AAE

Se trata de una familia con una epilepsia mioclónica fotosensible asociada a crisis parciales versivas y frecuentes estados epilépticos que representa un nuevo síndrome epiléptico. El estudio genético clínico en esta familia permitió sospechar una herencia materna y dirigir el análisis genético molecular hacia la identificación de una variación del ADN mitocondrial asociada a esta nueva forma de epilepsia.

Familia EIG-24

Se trata de una familia con una epilepsia generalizada con crisis febriles plus o GEFS+. El interés de esta familia reside de una parte en la descripción clínica ya que es una familia de gran tamaño en la que se observó una asociación con muerte súbita y de otra parte en la identificación de una nueva mutación en el gen codificante de la subunidad alfa-1 del canal de sodio cerebral (*SCN1A*).

Familia ED-HNP

Se trata de una familia con una epilepsia sintomática a una heterotopia nodular periventricular y un síndrome de Ehlers-Danlos. La asociación clínica familiar de ambos trastornos no era conocida hasta el momento. El análisis molecular evidenció una nueva mutación en el gen de la filamina (*FLNA*) segregando con ambos fenotipos. Esta familia ha sido motivo de una publicación y de la descripción posterior de otras familias similares.

1. INTRODUCCION

La epilepsia constituye una de las enfermedades neurológicas más frecuentes con una prevalencia del 0,5 al 1% y una incidencia de 40-80 casos por 100.000 habitantes/año. Esta incidencia tiene dos picos: uno en la infancia-adolescencia y otro en el anciano, siendo la incidencia acumulada a los 80 años del 3% [McHugh JC y col, 2008].

El carácter hereditario de la epilepsia se conoce desde la antigüedad. La observación de agrupación familiar y los estudios realizados en series de gemelos apoyan el origen genético de la epilepsia [Berkovic SF y col, 1998].

En los últimos años el estudio de epilepsias familiares ha contribuido enormemente a la investigación en la genética de las epilepsias. Los estudios de genética molecular han permitido la identificación de los genes implicados en estas epilepsias lo que ha supuesto un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y un estímulo para el desarrollo de nuevos fármacos y nuevas estrategias terapéuticas.

1.1 TERMINOLOGIA Y CLASIFICACION

1.1.1 Definiciones

Las definiciones recientemente propuestas por la International League against Epilepsy (ILAE) y el International Bureau for Epilepsy (IBE) [Fisher RS y col, 2005] son las siguientes:

- **Crisis epiléptica:** Conjunto de signos y/o síntomas que ocurren de forma transitoria como resultado de una actividad anormal excesiva y sincrónica de las neuronas cerebrales.
- **Epilepsia:** Desorden cerebral caracterizado por una predisposición subsistente a generar crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales derivadas de ello. La definición de epilepsia requiere la ocurrencia de al menos una crisis.

1.1.2 Clasificación de las crisis epilépticas y las epilepsias

La clasificación de las epilepsias es de gran importancia para estandarizar criterios diagnósticos entre epileptólogos. La clasificación inicial fue elaborada por la Liga Internacional contra la Epilepsia en el año 1981 [*Commission on Classification and Terminology of the Internacional League against Epilepsy, 1981 and 1989*].

En estos años se ha ampliado el conocimiento en este campo, lo que ha dado lugar a revisiones y propuestas de nuevas clasificaciones [*Engel J Jr et al, 2001*] [*Berg AT et al, 2010*]. Sin embargo el uso de estas nuevas clasificaciones no se ha extendido debido a su escasa aplicabilidad siendo la clasificación original la más aceptada y utilizada en la práctica clínica universal.

La **clasificación de las crisis epilépticas (Tabla 1)** se basa en la semiología clínica y en las características del electroencefalograma (EEG) crítico e intercrítico. Esta clasificación establece una división en crisis parciales (de inicio focal), crisis generalizadas (convulsivas o no convulsivas) y crisis no clasificables. La principal controversia de esta clasificación es la distinción entre crisis parciales simples y complejas en base a la alteración del nivel de conciencia, lo cual resulta en ocasiones muy difícil de establecer en la práctica clínica. Algunos tipos de crisis especialmente frecuentes en la infancia (espasmos epilépticos) no están incluidos.

La **clasificación de las epilepsias (Tabla 2)** se establece en base a dos criterios fundamentales: el tipo de crisis y la etiología.

Según el tipo de crisis se distinguen:

- Epilepsias focales, aquellas en las que las crisis tienen un comienzo limitado a un área de un hemisferio cerebral
- Epilepsias generalizadas, aquellas en las que el comienzo de las crisis implica a ambos hemisferios cerebrales
- Epilepsias indeterminadas si focales o generalizadas
- Síndromes especiales

Según la etiología se consideran:

- Epilepsias idiopáticas, no atribuibles a otra enfermedad y en la que se presume un origen o predisposición genética
- Epilepsias sintomáticas, de etiología conocida

- Epilepsias criptogénicas, en las que se sospecha una causa aunque ésta no pueda ser determinada.

Tabla 1. Clasificación internacional de las crisis epilépticas (ILAE, 1981)

Crisis parciales (inicio focal)

- A. Crisis parciales simples (sin alteración del nivel de conciencia)
 - a. Con signos motores
 - b. Con síntomas somatosensitivos o sensitivos especiales
 - c. Con síntomas autonómicos
 - d. Con síntomas psíquicos
- B. Crisis parciales complejas
 - a. Inicio como crisis parcial simple seguido de alteración de la conciencia
 - 1. Comenzando con características parciales simples
 - 2. Comenzando con automatismos
 - b. Con alteración de la conciencia desde el inicio
- C. Crisis parciales con evolución a secundariamente generalizadas
 - a. Crisis parciales simples con evolución a generalizadas
 - b. Crisis parciales complejas con evolución a generalizadas
 - c. Crisis parciales simples con evolución a complejas y a generalizadas

Crisis generalizadas (Convulsivas o no convulsivas)

- A. Ausencias
 - a. Ausencias
 - i. Solo alteración de la conciencia
 - ii. Con componentes clónicos
 - iii. Con componentes tónicos
 - iv. Con componentes atónicos
 - v. Con automatismos
 - vi. Con componentes autonómicos
 - b. Ausencias atípicas
- B. Crisis mioclónicas
- C. Crisis clónicas
- D. Crisis tónicas
- E. Crisis tónico-clónicas
- F. Crisis atónicas
- G. Crisis no clasificables (crisis neonatales, movimientos rítmicos oculares, movimientos de masticación....)

Tabla 2. Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos (ILAE, 1989)
--

I. Relacionados con una localización (focales o parciales)**A. Idiopáticos**

1. Epilepsia benigna de la infancia con puntas centrotemporales
2. Epilepsia benigna de la infancia con paroxismos occipitales
3. Epilepsia primaria de la lectura

B. Sintomáticos

1. Epilepsia parcial continua de la infancia (síndrome de Kojewnikow)
2. Síndromes caracterizados por crisis inducidas por estímulos específicos
3. Epilepsia del lóbulo temporal
4. Epilepsia del lóbulo frontal
5. Epilepsia del lóbulo parietal
6. Epilepsia del lóbulo occipital

C. Criptogénicos**II. Generalizados****A. Idiopáticos (por orden de edad)**

1. Convulsiones neonatales familiares benignas
2. Convulsiones neonatales benignas
3. Epilepsia mioclónica benigna del lactante
4. Epilepsia con ausencias de la infancia
5. Epilepsia con ausencias de la juventud
6. Epilepsia mioclónica juvenil
7. Epilepsia con crisis de gran mal (CGTC) al despertar
8. Otras epilepsias idiopáticas generalizadas
9. Epilepsias con crisis precipitadas por estímulos específicos

B. Criptogénicos o sintomáticos (por orden de edad)

1. Síndrome de West
2. Síndrome de Lennox-Gastaut
3. Epilepsia con crisis mioclónico-astáticas
4. Epilepsia con ausencias mioclónicas

C. Sintomáticos

1. Etiología inespecífica
 - a. Encefalopatía mioclónica precoz
 - b. Encefalopatía epiléptica infantil precoz con patrón de brotes-supresión
 - c. Otras epilepsias generalizadas sintomáticas
2. Etiología específica

Tabla 2. (continuación): Clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos (ILAE, 1989)**III. Indeterminados si focales o generalizados**

- A. Crisis neonatales
- B. Epilepsia mioclónica severa de la infancia
- C. Epilepsia con punta-onda continua durante el sueño lento
- D. Afasia epiléptica adquirida (Síndrome de Landau-Kleffner)

IV. Síndromes especiales

- A. Convulsiones febriles
- B. Crisis aisladas o estado epiléptico aislado
- C. Crisis provocadas en el contexto de un evento tóxico o metabólico agudo
(alcohol, drogas, preeclampsia, hiperglucemia no cetósica.....)

Dado que las propuestas del 2001 y 2010 tienen escasa aplicación clínica en el momento actual, en el desarrollo de esta tesis hemos seguido los criterios de la clasificación original de la ILAE que acabamos de exponer.

1.2 GENETICA DE LAS EPILEPSIAS**1.2.1 Generalidades**

La mayoría de las epilepsias genéticas presentan una herencia compleja en la que el fenotipo es el resultado de la interacción de múltiples genes (herencia poligénica) y de estos genes con el medio ambiente. Las formas más comunes de estas epilepsias se presentan de forma esporádica y los genes responsables son por el momento desconocidos. Solo el estudio de familias con una herencia monogénica o en las que existe un gen predominante ha permitido la identificación de algunos genes. Estos genes codifican en su mayoría a canales iónicos dependientes de voltaje y/o dependientes de ligando. Sin embargo estas formas familiares constituyen una excepción y por lo tanto, los genes identificados hasta el momento solo explican una minoría de casos.

La herencia poligénica y multifactorial da lugar a que la expresividad del fenotipo sea muy variable, siendo muy frecuente el solapamiento entre síndromes epilépticos distintos y la variabilidad en la expresión clínica y en la severidad de la

epilepsia entre los individuos de una misma familia, como ocurre en la Epilepsia Generalizada con crisis febriles plus (GEFS+).

La heterogeneidad genética y clínica complica aún más la relación genotipo/fenotipo. Un mismo tipo de epilepsia o síndrome epiléptico puede estar asociado a mutaciones en genes distintos (**heterogeneidad genética**) de la misma forma que mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a fenotipos distintos (**heterogeneidad clínica**).

1.2.2. Genética de las epilepsias idiopáticas generalizadas (EIG) Tabla 3

Las EIG constituyen el 20-30% de todas las epilepsias. Tradicionalmente están incluidas en este grupo:

- Epilepsia con ausencias de la infancia (**EAI**)
- Epilepsia con ausencias de la juventud (**EAJ**)
- Epilepsia mioclónica juvenil (**EMJ**)
- Epilepsia con crisis generalizadas tónico-clónicas solo al despertar (**ECGTC**)

Estas cuatro constituyen las formas de EIG más comunes. Se diferencian por la edad de inicio, los tipos de crisis y el EEG. Se han descrito múltiples loci potenciales de susceptibilidad en diferentes cromosomas. Sin embargo hasta el momento son pocos los genes identificados. En concreto se han descrito mutaciones a nivel de los genes codificantes de subunidades del receptor de GABA A, del canal de calcio y otros (*EFHC1*, *SLC2A1*).

Tabla 3. Genes implicados en las epilepsias idiopáticas generalizadas

TIPO DE EPILEPSIA	LOCUS	GEN	PROTEINA	REF.BIBLIOGRÁFICA
EIG mixta (ECGTC, EMJ, EAI, EAJ)	2q22-q23	<i>CACNB4</i>	Subunidad β -4 Canal calcio tipo T	<i>Escay AP et al, 2000</i>
Epilepsia Mioclónica juvenil	5q34-35	<i>GABRA1</i>	Subunidad α -1 Receptor GABA A	<i>Cossette P et al, 2002</i>
	1p36.3	<i>GABRD</i>	Subunidad delta Receptor GABA A	<i>Dibbens LM et al, 2004</i>
	6p12-p11	<i>EFHC1</i>	Mioclónina 1	<i>Suzuki T et al, 2004</i>
Epilepsia Ausencias infancia	16p13.3	<i>CACNA1H</i>	Subunidad α -1 Canal calcio tipo T	<i>Chen Y et al, 2003</i>
	5q34-35	<i>GABRA1</i>	Subunidad α -1 Receptor GABA A	<i>Maljevic et al, 2006</i>
	5q31.1-33.2	<i>GABRG2</i>	Subunidad γ -2 Receptor GABA A	<i>Wallace RH et al, 2001</i>
	5q11.2-12	<i>GABRB3</i>	Subunidad β -3 Receptor GABA-A	<i>Tanaka M et al, 2008</i>
E ausencias-ataxia episódica	19p13	<i>CACNA1A</i>	Subunidad α -1	<i>Jouvenneau A et al, 2001</i>
			Canal calcio tipo T	<i>Imbrici P et al, 2004</i>
E ausencias de inicio precoz	1p35-p31.3	<i>SLC2A1</i>	Transportador de Glucosa GLUT1	<i>Suls A et al, 2009</i>

1.2.3 Genética de las Epilepsias familiares

1.2.3.1 Epilepsia generalizada con crisis febriles plus (GEFS+)

La epilepsia generalizada con crisis febriles plus, conocida por las siglas GEFS+ en referencia al inglés, fue descrita por Scheffer y Berkovic en 1997 [Scheffer IE et al, 1997]. Se caracteriza por la presencia de crisis febriles y crisis afebriles de diferentes tipos en individuos de una misma familia. Esta forma de epilepsia se inicia en la infancia, generalmente en los primeros dos años de vida, coincidiendo con la edad de aparición de las crisis febriles. Existe una gran heterogeneidad clínica intrafamiliar, es decir que los individuos afectados de una misma familia presentan a menudo fenotipos clínicos distintos. Los fenotipos más comunes son las crisis febriles y las crisis febriles plus. El fenotipo de crisis febriles plus se define como:

- presencia de crisis febriles que persisten más allá de los 6 años de edad o
- presencia de crisis febriles y crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles en un mismo individuo.

Estos fenotipos (crisis febriles y crisis febriles plus) pueden asociarse a otros tipos de crisis generalizadas (ausencias, crisis mioclónicas, crisis atónicas) y de crisis focales (mayoritariamente crisis temporales). Dentro del espectro clínico existen fenotipos más severos como la epilepsia mioclono-astática (EMA), la epilepsia mioclónica severa de la infancia (EMSI) o la epilepsia intratable de la infancia con crisis generalizadas tónico-clónicas. Además, en algunas familias con GEFS + se observan fenotipos solapados con las formas de epilepsia idiopática generalizada más comunes, lo que sugiere que existe un componente genético común a todas ellas.

Esta forma de epilepsia presenta un modo de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta. Existe una heterogeneidad genética. Hasta el momento se han identificado cuatro genes implicados en este tipo de epilepsia que codifican las **subunidades beta 1, alfa 1 y alfa 2 del canal de sodio neuronal** y la **subunidad gamma 2 del receptor de GABA A**.

También se han descrito familias en las que no se ha encontrado ligamiento a las regiones cromosómicas descritas ni mutaciones en los genes conocidos hasta el momento, lo que confirma la existencia de otros genes, aún por descubrir, implicados en este tipo de epilepsia [Lerche H et al, 2001] [Malacarne M et al, 2002] [Bonanni P et al, 2004].

1.2.3.1.1 Canal de sodio

El canal de sodio neuronal es el más importante en epilepsia.

1.2.3.1.1.1 Subunidad beta 1 del canal de sodio neuronal (SCN1B)

El estudio de una gran familia afecta de GEFS+ condujo a Wallace y col en 1998 a evidenciar ligamiento a la región cromosómica 19q13 e identificar una mutación en el gen codificante para la subunidad beta 1 del canal de sodio neuronal dependiente de voltaje (*SCN1B*). Este fue el primer gen asociado a esta forma de epilepsia [Wallace RH et al, 1998] [Wallace RH et al, 2002]. Estudios posteriores han confirmado la asociación de este gen a la epilepsia generalizada con crisis febriles plus. Los estudios funcionales de mutaciones encontradas en este gen han mostrado una pérdida de la función moduladora de la subunidad beta en la cinética del canal de sodio [Xu R et al, 2007].

1.2.3.1.1.2 Subunidad alfa 1 del canal de sodio neuronal (SCN1A)

En 1999, los grupos de Baulac y Moulard identificaron de forma independiente el ligamiento al segundo locus (2q21-q33) en dos familias afectas de GEFS + [Baulac S et al, 1999] [Moulard B et al, 1999]. El estudio molecular de estas familias permitió hallar dos mutaciones diferentes en el gen codificante para la subunidad alfa 1 del canal de sodio neuronal dependiente de voltaje (*SCN1A*) [Escayg A et al, 2000]. Otros autores han confirmado posteriormente la asociación de mutaciones en *SCN1A* con familias afectas de GEFS+ [Wallace RH et al, 2001] [Escayg A et al, 2001] [Abou-Khalil B et al, 2001]. Este gen es en el que se han descrito un mayor número de mutaciones. En total se conocen más de cien mutaciones distintas asociadas a GEFS +, a la epilepsia mioclónica severa de la infancia (SMEI) y a otras epilepsias intratables de la infancia.

La mayoría de las mutaciones corresponden a mutaciones puntuales de cambio de sentido. Los estudios funcionales de estas mutaciones han mostrado una diversidad de cambios fisiológicos que conducen tanto a una pérdida como a una ganancia en la función del canal. Se ha observado además que una misma mutación puede ocasionar de forma simultánea efectos opuestos de pérdida y ganancia. En general, los mecanismos de pérdida de función predominan.

Mecanismos y mutaciones que conducen a una ganancia en la función del canal:

- Aceleración en la recuperación del canal desde la fase de inactivación, con acortamiento del periodo refractario y un aumento en la disponibilidad del canal para producir una nueva despolarización (mutación R1648H) [Alekov A et al, 2000] [Spampanato J et al, 2001].
- Fallo en la inactivación del canal que conduce a la presencia de una corriente de sodio persistente hacia el interior de la célula y a una despolarización prolongada de la membrana neuronal (mutaciones T875M, W1204R, R1648H) [Lossin C et al, 2002].
- Cambio en el voltaje de activación del canal hacia la hiperpolarización, lo que aumenta la ventana de corriente o el margen del potencial de membrana durante el cual los canales de sodio permanecen abiertos. Este cambio conduce a la presencia de corrientes de despolarización en potenciales próximos al potencial de reposo de la membrana neuronal (mutación W1204R) [Spampanato J et al, 2003].
- Resistencia a la disminución en la actividad del canal que se observa normalmente frente a la estimulación repetitiva en pulsos de elevada frecuencia (mutación D188V) [Cossette P et al, 2003].

Mecanismos y mutaciones que conducen a una pérdida en la función del canal:

- Aumento de la fase de inactivación del canal (mutaciones R1648H y T875M) [Alekov A et al, 2000 y 2001] [Spampanato J et al, 2001].
- Cambio en la curva de activación del canal hacia la despolarización (mutaciones I1656M, R1657C) [Lossin C et al, 2003].
- Pérdida completa en la función del canal (mutaciones V1353L y A1685V) [Lossin C et al, 2003].

En las condiciones de pérdida de función del canal, el mecanismo fisiopatológico por el que se produce la hiperexcitabilidad neuronal y las crisis no es bien conocido. Una hipótesis es que la disminución de función en las neuronas inhibitorias podría ser la causante de esta hiperexcitabilidad.

1.2.3.1.1.3 Subunidad alfa-2 del canal de sodio neuronal (SCN2A)

Aunque con mucha menos frecuencia, también se han descrito mutaciones en la subunidad alfa 2 del canal de sodio neuronal (*SCN2A*) asociadas al síndrome de GEFS + [Sugawara T et al, 2001]. Mutaciones en este mismo gen se han detectado en las convulsiones neonatales-infantiles familiares benignas [Heron SE et al, 2002] [Berkovic SF et al, 2004] [Herlenius E et al, 2007].

Los genes implicados en epilepsias familiares se resumen en la **tabla 4**.

Tabla 4. Epilepsias familiares en las que se han localizado genes

TIPO DE EPILEPSIA	LOCUS	GEN	PROTEINA	REF. BIBLIOGRÁFICA
E Generalizada con CF + (GEFS+)	2q24	<i>SCN1A</i>	Subunidad α -1 Canal de sodio	<i>Escayg A et al, 2000</i>
	2q24	<i>SCN2A</i>	Subunidad α -2 Canal de sodio	<i>Sugawara T et al, 2001</i>
	19q13	<i>SCN1B</i>	Subunidad β -1 Canal de sodio	<i>Wallace RH et al, 1998</i>
	5q34	<i>GABRG2</i>	Subunidad γ -2 Receptor GABA-A	<i>Baulac S et al, 2001</i>
CNFB	20q13.3	<i>KCNQ2</i>	Subunidad Q2 Canal de potasio	<i>Singh NA et al, 1998</i>
	8q24	<i>KCNQ3</i>	Subunidad Q3 Canal de potasio	<i>Charlier C et al, 1998</i>
CNIFB	2q24	<i>SCN2A</i>	Subunidad α -2 Canal de sodio	<i>Heron SE et al, 2002</i> <i>Berkovic SF et al, 2004</i>
ENFAD	20q13.2-q13.3	<i>CHRNA4</i>	Subunidad α -4 Receptor nicotínico	<i>Steinlein OK et al, 1995</i>
	1q21	<i>CHRNA2</i>	Subunidad β -2 Receptor nicotínico	<i>De Fusco M et al, 2000</i>
	8p21	<i>CHRNA2</i>	Subunidad α -2 Receptor nicotínico	<i>Aridon P et al, 2006</i>
	8q13	<i>CRH</i>	Hormona liberadora de corticotrofina	<i>Combi R et al, 2005</i>
FMTLE + HA	2q24	<i>SCN1A</i>	Subunidad α -1 Canal de sodio	<i>Colosimo E et al, 2007</i>
ADLTE	10q22-q24	<i>LGII</i>	Leucine-rich Glioma	<i>Kalachikov S et al, 2002</i>
			Inactivated gene 1	<i>Michelucci R et al, 2003</i>

CNFB: Convulsiones Neonatales Familiares Benignas, CNIFB: Convulsiones neonatales-infantiles familiares benignas, ENFAD: Epilepsia Nocturna Frontal Autosómico Dominante, FMTLE + HA: Epilepsia familiar temporal mesial con esclerosis hipocampo, ADLTE: Epilepsia temporal lateral autosómico dominante o epilepsia parcial autosómico dominante con síntomas auditivos (ADPEAF)

1.2.4 Genética de las malformaciones corticales

El grupo de epilepsias debidas a malformaciones del desarrollo cortical es amplio, heterogéneo y complejo. Los avances en el conocimiento de los genes implicados son cada vez mayores. Por ello, he decidido incluir en este apartado únicamente los aspectos genéticos de la heterotopia nodular periventricular, incluida dentro de las anomalías de la migración neuronal y presente en una de las familias descritas en esta tesis.

1.2.4.1 Heterotopia nodular periventricular

La Heterotopia nodular periventricular (HNP) es un trastorno de la migración neuronal caracterizado por la presencia de neuronas (morfológicamente normales) que migran de forma incorrecta hacia la corteza cerebral, formando nódulos o acúmulos a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales. La epilepsia, que constituye la manifestación clínica más importante, se presenta en alrededor de un 90% de los pacientes. Su inicio es entre los primeros meses de vida y la edad adulta. El tipo de crisis y el curso clínico son variables. Otros rasgos clínicos que pueden observarse asociados a la HNP son una disfunción intelectual, accidentes cerebrovasculares en pacientes jóvenes, disminución del tamaño del cuerpo calloso, megacisterna magna vs hipoplasia cerebelosa, trastornos cardiovasculares (ductus arterioso persistente, valvulopatía), hematológicos (coagulopatía, disfunción plaquetaria) o anomalías de las extremidades (acortamiento digital, clinodactilia, sindactilia) [Fox JW et al, 1998].

La HNP es un trastorno genéticamente heterogéneo. Existe una forma clásica de herencia dominante ligada al cromosoma X, una herencia autosómica recesiva asociada a microcefalia, retraso psicomotor severo y mutaciones en el gen *ARFGEF2* (ADP-Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 2) en la región cromosómica 20q13 [Sheen VL et al, 2003] [Sheen VL et al, 2004] y formas asociadas a anomalías cromosómicas en las regiones 1p36, 5p15 y 7q11 sin que se conozcan los genes implicados [Sheen VL et al, 2003] [Leefflang EP et al, 2003].

En la forma ligada al cromosoma X las mujeres heterocigotas resultan afectas y transmiten la enfermedad al 50% de sus hijas, mientras que los varones portadores de la mutación son inviables y fallecen durante el periodo prenatal o de forma inmediata tras el parto. Los estudios moleculares han mostrado ligamiento a la región cromosómica Xq28 [Walsh CA y col, 1995] y han permitido identificar mutaciones en el gen

codificante para la filamina A (*FLNA*) [Fox JW et al, 1998]. Hasta el momento este es el único gen asociado a la forma pura de HNP. Se han descrito alrededor de cien mutaciones en este gen; la mayoría de ellas corresponden a mutaciones de tipo “nonsense” (sin sentido) o “frameshift” (error en la pauta de lectura del gen) que producen la ruptura precoz de la proteína y consecuentemente su pérdida de función. Aproximadamente un 50% de las mutaciones son heredadas de la madre y un 50% corresponden a mutaciones de novo. La mayoría (>90%) de las familias presentan mutaciones en *FLNA* mientras que solamente el 20% de los casos esporádicos muestran mutaciones en este gen.

Aunque la gran mayoría de los pacientes con HNP son mujeres, se han descrito individuos del sexo masculino con HNP y mutaciones en *FLNA* [Sheen VL et al, 2001]. La HNP debida a mutaciones en *FLNA* en varones resulta de diferentes mecanismos genéticos incluyendo mutaciones puntuales poco severas y mutaciones en mosaico [Guerrini R et al, 2004].

La filamina es una proteína de unión a la actina. Su estructura homodimérica es similar a la de una inmunoglobulina (**Figura 1**). Cada subunidad está formada por:

- un dominio de unión a la actina F o ABD (“actin binding domain”) de homología con la calponina en el extremo N-terminal de la proteína
- un dominio de dimerización (autounión) y de unión a glicoproteínas de membrana en el extremo C-terminal de la proteína
- una región intermedia formada por 24 repeticiones de 96 aminoácidos en estructura beta plegada

La filamina actúa facilitando el entrecruzamiento de los filamentos de actina en redes ortogonales. Su función principal es la reorganización del citoesqueleto de actina, esencial en el control de la forma y motilidad celular. Además interacciona con numerosas proteínas (más de 20 hasta la fecha) incluyendo glicoproteínas de membrana que juegan un papel importante en el anclaje del citoesqueleto y en la transducción de señales al interior de la célula. La mayoría de estas interacciones suceden en el extremo C-terminal de la proteína.

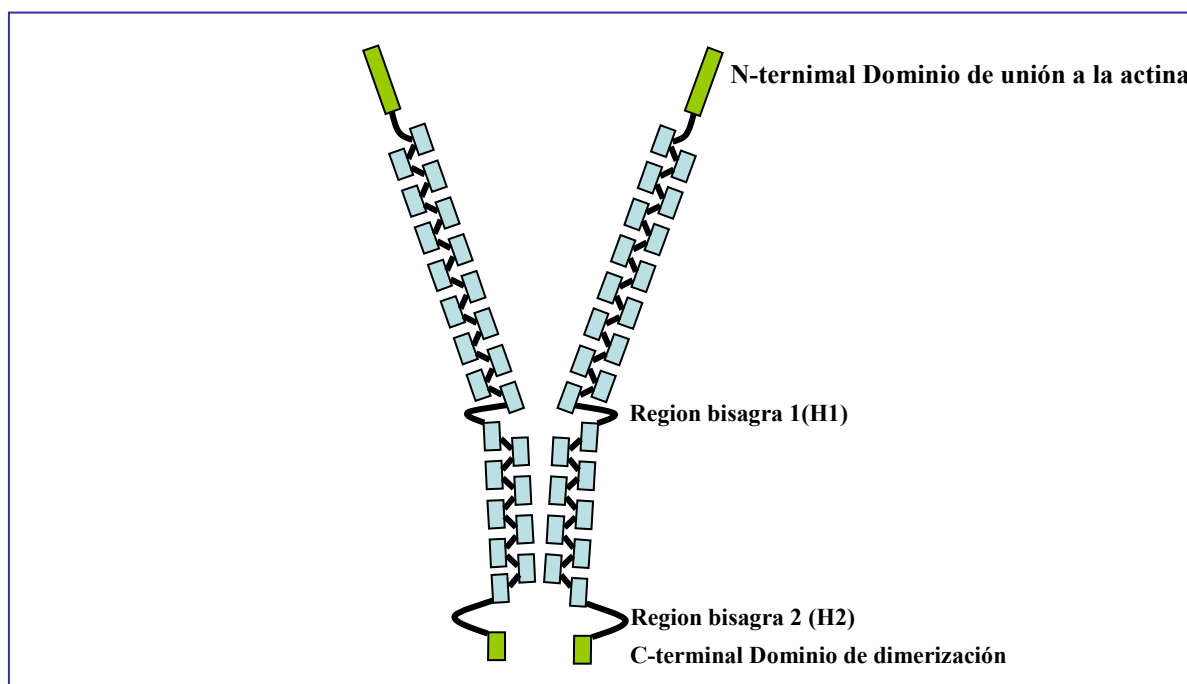


Figura 1. Esquema de la estructura de la filamina

Las mutaciones en *FLNA* no solo resultan en la heterotopia nodular periventricular. Recientemente mutaciones en este mismo gen se han asociado a cuatro síndromes malformativos congénitos: Displasia frontometafisaria, Síndromes otopalatodigitales tipo 1 y 2 (OPD 1 y OPD 2) y Síndrome de Melnick-Needles. Estos síndromes constituyen displasias esqueléticas asociadas a un conjunto heterogéneo y variable de malformaciones a nivel craneofacial, cardíaco, genitourinario e intestinal. Se trata de condiciones alélicas con rasgos clínicos comunes y fenotipos superponibles [Robertson SP et al, 2003]. Ninguno de estos síndromes presenta heterotopia nodular periventricular. Una hipótesis es que estos fenotipos son resultado de mutaciones que inducirían una ganancia funcional de la proteína a diferencia de las mutaciones detectadas en la HNP que ocasionan una pérdida de función.

Esto confirma que la filamina interacciona con múltiples proteínas y que está implicada no solamente en la formación del tejido nervioso sino en el desarrollo de múltiples tejidos.

1.2.5 Genética de las epilepsias asociadas a enfermedades mitocondriales

Las mitocondrias son las principales organelas productoras de energía en la célula eucariota. Esto es debido a la formación de ATP (adenosin trifosfato, molécula de intercambio energético) que se produce durante la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la cadena respiratoria mitocondrial. Los trastornos mitocondriales constituyen las enfermedades metabólicas más frecuentes.

1.2.5.1 Características clínicas de las enfermedades mitocondriales

Los desórdenes mitocondriales constituyen un amplio grupo de enfermedades multisistémicas con una expresión clínica enormemente compleja y heterogénea. Los órganos de mayor consumo energético (sistema nervioso central, corazón, riñón, ojos y oído...) son los más afectados.

Hasta el momento se han descrito numerosos síndromes mitocondriales específicos aunque en la práctica clínica muchos pacientes se presentan con fenotipos atípicos o no acordes con un síndrome bien definido. Es muy frecuente el solapamiento entre fenotipos.

La gran variabilidad clínica, tan característica de los trastornos mitocondriales, depende de tres características propias y muy particulares de la genética mitocondrial:

- El *efecto umbral* de la mutación; es decir, la cantidad de ADN mitocondrial mutado a partir del cual se expresa la disfunción mitocondrial y los síntomas de enfermedad. Esto hace que los individuos portadores de la mutación requieran un mínimo número de copias defectuosas para expresar la enfermedad, mientras que individuos portadores que no alcancen el nivel crítico no manifestarán síntomas.
- La *heteroplasmia*; es decir, la coexistencia de moléculas de ADN normal con moléculas de ADN mitocondrial portadoras de una mutación en una misma célula e incluso en una misma mitocondria. El grado de heteroplasmia (porcentaje relativo de ADN mitocondrial mutado con respecto al normal) en los diferentes individuos y en los diferentes órganos y tejidos, condiciona la variabilidad en la expresión clínica y severidad de la enfermedad mitocondrial.
- La *segregación mitótica* durante los procesos de división celular, que hace que la proporción de moléculas de ADN mitocondrial mutadas varíen de las células madres a las células hijas, originando cambios en el fenotipo. Esto se traduce en modificaciones

del fenotipo y de la expresión clínica de la enfermedad a lo largo del crecimiento y de la vida del individuo.

1.2.5.2 Modo de herencia de los trastornos mitocondriales

El ADN mitocondrial consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena que contiene 37 genes: 22 genes codificantes para ARN de transferencia (ARNt), 2 genes codificantes para ARN ribosómico (ARNr) y 13 genes codificantes para subunidades de la cadena respiratoria. El resto de genes codificantes para subunidades de la cadena respiratoria y otros genes esenciales en el control de la función mitocondrial se encuentran en el ADN nuclear o genómico. De esta forma, las enfermedades mitocondriales pueden proceder de defectos en genes nucleares y de defectos en genes mitocondriales, mostrando patrones de herencia distintos.

En el caso de mutaciones del ADN mitocondrial se observa un patrón de herencia materna en el que la madre portadora de la mutación transmitirá el defecto a todos sus hijos, tanto varones como hembras (ya que todas las mitocondrias son heredadas de la madre) y sólo las hijas podrán a su vez transmitir la mutación a su descendencia.

En el caso de mutaciones del ADN nuclear, el patrón de herencia es mendeliano autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al sexo.

Se han identificado numerosas mutaciones del ADN mitocondrial asociadas a síndromes clínicos específicos. Estas mutaciones son de 3 tipos:

- Deleciones en la mayoría de los casos esporádicas (pej. en el síndrome de Kearns-Sayre o en la oftalmoplejia externa crónica progresiva)
- Mutaciones puntuales en genes implicados en la síntesis proteica (pej. mutaciones en los ARN de transferencia de leucina y lisina en los síndromes de MELAS y MERRF)
- Mutaciones puntuales en genes codificantes para subunidades de la cadena respiratoria (pej. mutación en el gen codificante de la ATPasa en el síndrome de NARP cuyas siglas hacen referencia a la combinación de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa características del síndrome).

En cuanto al ADN genómico son cada vez más numerosas las mutaciones descritas en genes nucleares asociadas a desórdenes mitocondriales.

La genética de las enfermedades mitocondriales constituye en la actualidad un campo de investigación en pleno desarrollo y de enorme interés científico.

1.2.5.3 Epilepsia asociada a trastornos mitocondriales

El sistema nervioso central es uno de los órganos más frecuentemente afectados en los trastornos mitocondriales y las crisis epilépticas constituyen uno de los síntomas más comunes. La expresión clínica de esta epilepsia es muy variable: se han descrito formas de epilepsia focal (desde un estatus parcial motor y/o epilepsia parcial continua a epilepsias multifocales), formas de epilepsia generalizada, epilepsias mioclónicas progresivas y encefalopatías epilépticas, que se presentan de forma esporádica o familiar, asociadas a mutaciones del ADN mitocondrial o del ADN nuclear.

Sin embargo y a pesar de que la epilepsia es una manifestación clínica muy común en este grupo de enfermedades, son pocos los síndromes epilépticos familiares mitocondriales reconocidos y escasos los artículos enfocados a definir los fenotipos de epilepsia asociados a este grupo de enfermedades [*Canafoglia L y col, 2001*] [*Lee YM y col, 2008*].

Dos son los síndromes mitocondriales reconocidos clásicamente asociados a epilepsia: el síndrome de MELAS (acrónimo en referencia al inglés de Mitochondrial Encephalopathy with Lactic Acidosis and Stroke like episodes) y el síndrome de MERRF (acrónimo en referencia al inglés de Myoclonus Epilepsy with Ragged-Red Fibers). Aunque la relación de ambos síndromes con la epilepsia es largamente conocida, en la actualidad se ha observado que la mayoría de los pacientes con epilepsia y una alteración mitocondrial se corresponden con síndromes mitocondriales no típicos [*Canafoglia L y col, 2001*].

1.2.5.3.1 Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares (MELAS)

El síndrome de MELAS se caracteriza clínicamente por la combinación de accidentes cerebrovasculares (generalmente localizados en regiones corticales parieto-occipitales que exceden los territorios vasculares habituales), cefaleas de tipo migraña, acidosis láctica y crisis epilépticas.

El tipo de crisis más frecuentemente descrito son las crisis focales con síntomas motores, que pueden aparecer de forma aislada o repetitiva dando lugar a un estatus parcial motor y/o una epilepsia parcial continua. El electroencefalograma muestra

descargas focales y multifocales. Puede existir fotosensibilidad. De hecho, la presencia de respuesta fotoparoxística junto con crisis parciales motoras es un hallazgo inhabitual por lo que algunos autores han sugerido que éste podría ser un rasgo marcador de encefalopatías mitocondriales [Canafoglia L y col, 2001].

Aproximadamente un 80% de los casos de MELAS se asocian a una mutación puntual de cambio de nucleótido (3243 A→G) en el gen *MTTL1* (gen codificante para el ARNt de leucina) [Kobayashi Y y col, 1991] [Goto Y y col, 1992]. El resto de casos se asocian a diferentes mutaciones en el mismo gen, en genes codificantes para otros ARN de transferencia y en genes codificantes para subunidades del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

1.2.5.3.2 Epilepsia mioclónica con fibras musculares rojo rasgadas (MERRF)

El síndrome de MERRF se caracteriza por la presencia de mioclonus, epilepsia, ataxia cerebelosa y miopatía con fibras rojo rasgadas. Otros signos/síntomas pueden aparecer, como son: neuropatía, sordera, atrofia óptica, oftalmoplejia o lipomas cutáneos. La evolución es hacia un deterioro neurológico progresivo. Clásicamente este síndrome ha sido incluido en el grupo de las epilepsias mioclónicas progresivas.

La epilepsia es una epilepsia mioclónica caracterizada por la aparición de crisis mioclónicas y/o crisis tónico-clónicas generalizadas asociadas a mioclonus multifocal. El electroencefalograma por lo general muestra descargas generalizadas de polipunta-onda. Puede existir fotosensibilidad.

El síndrome de MERRF es al igual que el síndrome de MELAS genéticamente heterogéneo. Se han descrito mutaciones en diferentes genes, el mayoritario de ellos es el gen *MTTK* (gen codificante para el ARNt de lisina). El 80% de los casos asocian mutaciones puntuales de cambio de nucleótido (A por G) en la posición 8344 de este gen. [Shoffner JM y col, 1990] [Yoneda M y col, 1990].

Además se han descrito mutaciones en genes codificantes para otros ARN de transferencia y para la subunidad 5 del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria mitocondrial.

Existen pacientes con encefalopatías mitocondriales que presentan un fenotipo solapado entre el MELAS y el MERRF. En la **Tabla 5** se resumen los genes asociados a epilepsias mitocondriales.

Tabla 5. Genes asociados a epilepsias mitocondriales

Gen	Proteína	Fenotipo
<i>MTTL1</i>	ARNt leucina	MELAS (3243A-G) MERRF MERRF/MELAS
<i>MTTK</i>	ARNt lisina	MERRF (8344A-G) MELAS MERRF/MELAS
<i>MTTH</i>	ARNt histidina	MERRF/MELAS
<i>MTTQ</i>	ARNt glutamina	MELAS
<i>MTTS1</i>	ARNt serina 1	MERRF/MELAS
<i>MTTS2</i>	ARNt serina 2	MERRF/MELAS
<i>MTTF</i>	ARNt fenilalanina	MELAS MERRF Epilepsia severa
<i>MTND1</i>	Subunidad ND1 complejo I	MELAS
<i>MTND5</i>	Subunidad ND5 complejo I	MERRF MERRF/MELAS
<i>MTND6</i>	Subunidad ND6 complejo I	MELAS

2. OBJETIVOS

1. Identificar familias con múltiples miembros afectados de epilepsia
2. Analizar el patrón de herencia en cada familia a través del análisis de segregación
3. Analizar los fenotipos epilepticos mediante la caracterización clínica de cada individuo afecto con el fin de clasificar el tipo de epilepsia, reconocer y definir nuevos síndromes epilépticos
4. Descubrir nuevas mutaciones y genes implicados en epilepsias familiares

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 ESTUDIO GENETICO CLINICO

3.1.1 Selección de familias

Un total de 52 familias con epilepsias generalizadas y 20 familias con epilepsias focales fueron reclutadas en el laboratorio entre los años 1996 y 2004. De todas ellas 3 han sido las familias seleccionadas e incluidas en esta tesis. Las familias seleccionadas aparecen identificadas como AAE, EIG-24 y ED-HP.

El ámbito de reclutamiento fue la unidad de epilepsia de la Fundación Jiménez Díaz en colaboración con distintos centros hospitalarios de la geografía española.

Los criterios de inclusión para el estudio fueron los siguientes:

1. Familias con al menos dos relativos de primer grado afectos de epilepsia, de una misma o distinta generación.
2. Disposición a participar en el estudio y aceptación mediante un consentimiento informado.

El estudio fue aprobado por el Comité Etico de la Fundación Jiménez Díaz.

3.1.2 Historia familiar y construcción del arbol genealógico

A través de una entrevista a los familiares se identificaron los individuos afectos y sanos. Los individuos considerados sanos fueron evaluados mediante un cuestionario de despistaje de crisis epilépticas con el fin de detectar portadores asintomáticos. Otros datos obtenidos en la historia familiar fueron el origen de la familia, nombre, apellidos y fecha de nacimiento de los individuos que la componen, la presencia de uniones consanguíneas, abortos y concurrencia de otras enfermedades.

La historia familiar fue esencial para la construcción del árbol genealógico o pedigree. El pedigree constituye una representación gráfica de la transmisión de un determinado rasgo genético o enfermedad. La construcción del pedigree requiere la utilización de un conjunto de símbolos estandarizados [Davenport y col, 1911] [Carr-Saunders y col, 1912-1913]. Los varones se representan con un cuadrado y las mujeres con un círculo. El individuo afecto a partir del cual se inició el estudio de la familia o probando se identifica con una flecha. En la **figura 2** se muestran algunos de los símbolos más comúnmente utilizados en el diseño de pedigrees.

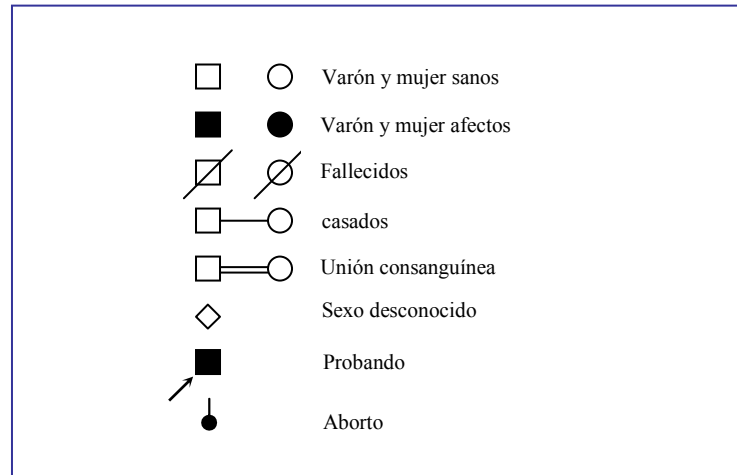


Figura 2. Símbolos comúnmente utilizados en el diseño del pedigree

Los números romanos se utilizan para identificar las sucesivas generaciones, que se numeran desde la más antigua a la más reciente y los números arábigos para identificar a los individuos pertenecientes a cada generación comenzando desde la izquierda. La línea de herencia paterna se sitúa a la izquierda y la línea materna a la derecha. Los descendientes de cada pareja de progenitores se representan de izquierda a derecha según su orden de nacimiento. **Figura 3**

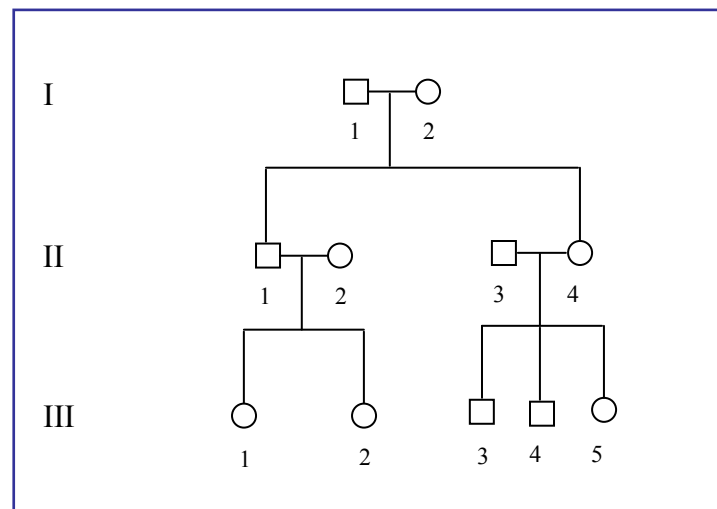


Figura 3. Esquema básico de construcción de un pedigree

El análisis del pedigree es una herramienta esencial en los estudios genéticos ya que permite definir el patrón de herencia de un rasgo o enfermedad. Además constituye la base para el análisis de ligamiento en el mapeo de genes y para estimar el riesgo de recurrencia de la enfermedad de cara al consejo genético.

Los diferentes patrones de herencia que pueden inferirse a partir del análisis del pedigree siguiendo los principios de Mendel son:

- Herencia autosómico dominante: El riesgo de recurrencia en la descendencia es del 50% independientemente del sexo. Los individuos afectados son por lo general heterocigotos para el gen mutado. Los trastornos autosómicos dominantes se caracterizan en general por una penetrancia reducida y una expresividad variable.
- Herencia autosómico recesiva: El riesgo de recurrencia en la descendencia es del 25%. El individuo afecto es homocigoto para el gen mutado. La consanguinidad familiar es frecuente. A diferencia de los trastornos autosómicos dominantes, las enfermedades autosómicas recesivas presentan una menor variabilidad en la expresividad clínica y una mayor penetrancia.
- Herencia recesiva ligada al cromosoma X: En este modo de herencia los individuos afectados son del sexo masculino. No hay transmisión directa entre individuos varones. Las mujeres portadoras transmiten el gen mutado al 50% de sus hijos varones que resultarán afectados y al 50% de sus hijas que serán portadoras de la enfermedad.
- Herencia dominante ligada al cromosoma X: Este tipo de herencia es más difícil de identificar, ya que pueden existir individuos afectados de los dos sexos, de forma similar a lo que ocurre en un patrón de herencia autosómico dominante. En general los varones manifiestan de forma grave la enfermedad mientras que las mujeres presentan una severidad variable del cuadro clínico. En ocasiones la herencia dominante ligada al X se asocia a una letalidad en los varones, dando lugar a pedigrees en los que solo las mujeres predominan en número y son afectas mientras que existe un incremento de abortos masculinos. Ejemplos de este tipo de herencia son la incontinencia pigmenti, los síndromes otopalatodigitales y la heterotopia nodular periventricular.

3.1.3 Fenotipaje clínico de los individuos afectados

Se obtuvo una historia clínica mediante entrevista personal y revisión de las historias e informes médicos de cada individuo afecto. Se realizó un examen físico y neurológico completo a cada uno de los pacientes y se revisaron los estudios complementarios disponibles con el fin de caracterizar el fenotipo.

El estudio del fenotipo en cada paciente consistió en la caracterización de su epilepsia en base a la edad de inicio de las crisis, el tipo de crisis, los factores desencadenantes, los signos y síntomas asociados, el examen neurológico, los hallazgos del electroencefalograma, los resultados de la neuroimagen, la evolución clínica de la epilepsia y su respuesta al tratamiento. El tipo de epilepsia y síndrome epiléptico fue establecido en cada individuo afecto según los criterios definidos por la clasificación de crisis epilépticas y de epilepsias y síndromes epilépticos aprobados por la Liga Internacional contra la Epilepsia [*Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981 y 1989*].

3.1.4 Estudio cardiológico de la familia EIG-24

La presencia de muerte súbita en tres individuos de esta familia, afecta de una epilepsia generalizada con crisis febriles plus (GEFS+) y una mutación en la subunidad alfa-1 del canal de sodio cerebral (*SCN1A*), llevó a la realización de un estudio cardiológico completo con el fin de detectar arritmias cardíacas malignas responsables de la muerte súbita.

Se estudiaron cuatro individuos afectados de epilepsia y portadores de la mutación (II-3, III-11, III-14 y III-17) y tres controles sanos (III-7, III-12 y III-16) de la misma unidad familiar.

La evaluación cardiológica incluyó:

- Historia clínica cardiológica
- Electrocardiograma de 12 derivaciones
- Holter de 12 derivaciones (dos estudios de 24h)
- Ecocardiograma transtorácico
- Ergometría o test de esfuerzo (encaminada a detectar arritmias inducibles por el ejercicio)
- Test de flecainida. Se basa en la administración de flecainida por vía intravenosa a una dosis protocolizada y universalmente aceptada de 2 mg/kg en 5' hasta un máximo de 150 mg. Este test se utiliza para el despistaje del síndrome de Brugada
- Test de isoproterenol. Se basa en la infusión intravenosa de isoprenalina a una dosis protocolizada y universalmente aceptada de 1µg/kg/min con aumento gradual de 1µg/min cada 5' hasta conseguir un aumento del

25% de la frecuencia cardíaca o la aparición de las alteraciones electrocardiográficas buscadas. Este test se utiliza para el despistaje del síndrome de QT largo.

El estudio cardiológico fue realizado en la Unidad de Arritmias del Hospital Clínico San Carlos de Madrid bajo la supervisión de los Dres. Pérez Castellano y Pérez Villacastín.

3.2 ESTUDIO GENETICO MOLECULAR

3.2.1 Recogida de muestras

Se extrajeron entre 15 y 20 ml de sangre venosa en tubos EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) de cada familiar afecto y sano que aceptó colaborar en el estudio. La participación fue autorizada por los propios pacientes o sus tutores legales (en caso de menores de edad o incapacitados para firmar). La sangre fue almacenada en tubos de plástico y congelada en las 24-48 h posteriores a la extracción a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

3.2.2 Extracción del ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de linfocitos de sangre periférica según se describe en el manual de Sambrook y Russell (2001). La extracción se realizó manualmente, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Método de extracción manual del ADN:

1. Se parte de 10 ml de sangre con anticoagulante EDTA
2. Se añaden 10 ml de tampón de lisis 2x (Applied Biosystems, Foster City, Canada) precalentado a 37°C
3. Se añaden 300 μl de proteinasa K (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) a una concentración de 10 mg/ml
4. Se mezcla e incuba durante 12 horas (una noche completa) a 50°C en un baño de agua caliente con agitación constante.
5. Se separa el ADN con fenol:
 - a. Se añade 1/2 volumen (10 ml) de fenol
 - b. Se centrifuga durante 10' a 2500 rpm
 - c. Se recupera el sobrenadante

Se deben repetir estos pasos entre 2 y 3 veces. En caso de no lograr una buena separación de fases se puede repetir el proceso usando una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).

6. Se recoge el sobrenadante y se añade 1/2 volumen de acetato amónico 5M y 2 volúmenes de Isopropanol previamente enfriado a -20° C. Se mezcla invirtiendo el tubo varias veces hasta que el ADN precipita formando un ovillo.
7. Se recoge el ovillo de ADN y se lava con etanol al 70%. Se centrifuga a 3000 rpm 30".
8. Se dejan evaporar los restos de etanol al aire.
9. Se resuspende el ADN en 1ml Tris-EDTA

La concentración y pureza del ADN se calculó midiendo la absorbancia de luz a longitudes de onda (λ) 260, 280 y 320 nm mediante espectrofotómetro GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suecia). Tras medir la concentración del ADN se obtuvieron alícuotas a una concentración de 20 μ g/ml para realizar posteriormente las amplificaciones mediante PCR.

El ADN de todos los individuos estudiados se obtuvo según este protocolo a excepción del individuo II-10 de la familia AAE (fallecido en el momento del estudio) en el que se extrajo a partir de una muestra de tejido cerebral embebido en parafina. El ADN en este paciente se extrajo a partir de cortes de tejido cerebral de 5 μ m y 25 μ g de peso máximo. Los cortes se sometieron a dos lavados con 1.2 ml de xileno seguido de 1.2 ml de etanol absoluto. Posteriormente se empleó un kit especial de extracción de ADN de parafina (DNeasy Tissue Kit de Quiagen, Helden, Alemania).

3.2.3 Amplificación del ADN mediante PCR

La amplificación de los fragmentos de ADN a estudio se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en plato multipocillo.

Método de amplificación del ADN por PCR

1. Se prepara la mezcla de reacción de la PCR con el siguiente contenido:

10 x Tampón PCR	1 μ l x n° muestras
dNTPs 2mM	1 μ l x n° muestras
MgCl ₂ 25mM	0,6 μ l x n° muestras

Primer-F (20 μ M) 0,2 μ l x n° muestras

Primer-R (20 μ M) 0,2 μ l x n° muestras

Taq-polimerasa 0,06 μ l x n° muestras

Agua estéril hasta 8 μ l x n° muestras

2. Se deposita en cada pocillo 1,5 μ l de ADN genómico a 20 μ g/ml.
3. Se añade 10 μ l de la mezcla de reacción a cada pocillo.
4. Se agita suavemente el plato de pocillos con el fin de mezclar bien el ADN con la mezcla de reacción.
5. Se añaden 10 μ l de aceite mineral en cada pocillo para evitar la evaporación de las muestras.
6. Se procesan las muestras en el termociclador mediante una desnaturalización inicial de 2 minutos y 35 ciclos de amplificación. Los 35 ciclos finalizan con una fase de extensión final de 6 minutos a 74°C.

Las condiciones estándar de la PCR fueron las siguientes:

1. 94°C 2'
2. 35 ciclos sucesivos de:
 - a. 94°C 30''
 - b. 60°C 1'
 - c. 74°C 30''
3. 74°C 6'

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa y extraídos mediante el Qiaquick Gel Extraction Kit (Quiagen Inc, Valencia, California, USA).

3.2.4 Secuenciación del ADN

La secuenciación directa de los fragmentos de ADN amplificados se llevó a cabo mediante la utilización de un kit de secuenciación con Taq FS DNA polimerasa, el Dye-Terminator cycle-sequencing kit (Perkin-Elmer, Warrington, UK). La lectura de los fragmentos se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM-377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los resultados fueron analizados mediante un programa informático ABI analysis software (versión 3.1).

Los cebadores implicados en la secuenciación del gen *SCN1A* (familia EIG 24) y de los exones 2 al 5 del gen *FLNA* (familia ED-HP) fueron los siguientes:

Cebadores empleados en la secuenciación del gen *SCN1A*

Cebador directo (s1A26F)	Cebador inverso (s1A26R)
5'GCAACAGCATGATCTGCCTA-3'	5'AGCTTCCAGGGTTAACTTTATT-3'

Cebadores empleados en la secuenciación de los exones 2 al 5 del gen *FLNA*

	Cebador directo	Cebador indirecto
Exon 2	5'TCTCGCTGGGAAATTACG3'	5'CCTTCCTGCGTGCCTCAG3'
Exon 3-5	5'CATCTTCTCACCGGTGCGAC3'	5'AATCTACCCTGTGACAGAATAC3'

3.2.5 Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

El acrónimo **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphisms) hace referencia al estudio de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción. Esta técnica se basa en la existencia en el ADN de secuencias específicas de nucleótidos que son reconocidas y cortadas por un enzima o endonucleasa de restricción. Esta técnica se utiliza en el screening de mutaciones. En ocasiones el sitio de restricción del enzima está localizado a nivel del gen transmisor de la enfermedad y de la secuencia mutada. Esto permite a través del análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción en una familia identificar y diferenciar los individuos portadores de los no portadores de la mutación.

La técnica RFLP consiste en:

1. Extracción y purificación del ADN del individuo/s que se desea/n analizar
2. Amplificación del segmento de ADN que nos interesa estudiar mediante PCR empleando los cebadores específicos
3. Tratamiento mediante las enzimas de restricción que cortan el ADN obteniendo fragmentos de distinta longitud
4. Separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa obteniendo un patrón de bandas característico de cada individuo

5. Tinción mediante bromuro de etidio

En la familia AAE se utilizó el enzima de restricción *Csp45I* (Promega). Este enzima tiene su sitio de corte justo a nivel de la secuencia donde se localizó la variación. La secuencia reconocida por el enzima es la siguiente:

TTXCGAA

AAGCXTT

donde las X marcan los sitios exactos de corte y A marca la posición de la variación encontrada.

Cebadores empleados en el análisis RFLP de la familia AAE

Cebador directo (AAE-RFLP-F)	Cebador inverso (AAE-RFLP-R)
5'AGTTAACAGCTAAGCACCTAATCA3'	5'AAATCTAAAGACAGGGGTTAGGC3'

3.2.6 Análisis de polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas del ADN (SSCP)

La **SSCP** (single-strand conformation polymorphism) o análisis de polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas del ADN se emplea en la detección de polimorfismos y mutaciones. Se basa en la diferente movilidad electroforética de las cadenas sencillas del ADN dependiendo de su estructura tridimensional lo que a su vez depende de su secuencia de nucleótidos. Las mutaciones inducen un cambio en la estructura tridimensional y en la movilidad electroforética de la cadena de ADN permitiendo de esta forma distinguir los individuos sanos de los portadores de una mutación.

La técnica SSCP consiste en:

1. Extracción y purificación del ADN del individuo/s que se desea/n analizar
2. Amplificación de la secuencia a estudio mediante PCR utilizando cebadores específicos
3. Desnaturalización del ADN obteniendo cadenas simples
4. Renaturalización para favorecer apareamientos intracatenarios
5. Electroforesis en gel de poliacrilamida obteniendo un patrón de bandas característico de cada individuo (kit GeneGel Excel 12.5/24, Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suecia)

6. Tinción de bandas mediante nitrato de plata (kit PlusOne DNA Silver Staining, Amersham Pharmacia Biotech, AB, Suecia).

3.2.7 Análisis de microsatélites

Los microsatélites son polimorfismos del ADN basados en secuencias nucleótídicas de repetición distribuidas a lo largo de todo el genoma. Son identificados por las siglas SSR (Short Sequence Repeat) o STR (Short Tandem Repeat) en referencia al inglés. Consisten en secuencias cortas de 2 a 6 nucleótidos repetidas en tandem en un número variable. La gran variabilidad en el número de repeticiones da lugar a múltiples alelos. Estos polimorfismos son de gran utilidad en la localización cromosómica de genes asociados a enfermedades. Son muy abundantes y muy variables entre la población y por lo tanto muy informativos.

El análisis de microsatélites requiere:

1. Amplificación de los marcadores microsatélite mediante PCR con cebadores específicos.
2. Separación de los fragmentos obtenidos en base a la longitud en pares de bases mediante electroforesis en gel de agarosa o gel de poliacrilamida
3. Visualización de los microsatélites mediante tinción con bromuro de etidio utilizando luz ultravioleta (geles de agarosa) o tinción con nitrato de plata (geles poliacrilamida). Posteriormente estos geles se secaron y fueron expuestos a películas X-OMAT UV (Kodak, Illinois, USA) durante 1-14 horas.

El análisis de haplotipos se realizó utilizando el programa Cyrillic (versión 2.02)

3.2.8 Análisis de ligamiento

El ligamiento consiste en la transmisión conjunta de dos loci que se sitúan próximos en el cromosoma. El grado de ligamiento viene determinado por la probabilidad de recombinación entre los loci lo que se conoce como frecuencia de recombinación (θ). Esta frecuencia de recombinación es de 0 para loci muy próximos y de 0,5 para loci muy alejados. Se considera que existe ligamiento genético cuando la θ es menor de 0,5. El objetivo del análisis de ligamiento es identificar los marcadores genéticos que segregan con una enfermedad de forma

estadísticamente significativa, lo que permite localizar por proximidad a los genes implicados en dicha enfermedad.

Para el análisis de ligamiento se utilizaron de forma estandar 386 marcadores de tipo microsatélite dispersos por todo el ADN genómico y separados entre si una distancia media de 10 cM. Estos marcadores se obtuvieron a partir del set del centro de cooperación de ligamiento humano (Cooperative Human Linkage Center, CHLC human screening set/Weber versión 8,8A). En algunos casos se requirieron marcadores adicionales para aumentar la resolución de algunas regiones cromosómicas.

La medida estadística de ligamiento es la puntuación LOD. La puntuación LOD es el logaritmo de la probabilidad a favor de ligamiento de dos loci comparado con su transmisión independiente. Una puntuación LOD >3 representa una probabilidad teórica de 1000 a 1 y se acepta generalmente como prueba de ligamiento. Una puntuación LOD de -2 es excluyente de ligamiento. Valores de la puntuación LOD entre -2 y 3 se consideran no significativos. Durante el análisis de ligamiento las puntuaciones LOD son calculadas para muchas frecuencias de recombinación posibles. La fracción de recombinación con la puntuación LOD más alta permite estimar la distancia entre el marcador y el gen potencialmente ligado a la enfermedad. La puntuación LOD se calcula con la ayuda de programas informáticos. En este trabajo se empleó el programa MLINK de paquetes de programas LINKAGE (version 5.20) y FASTLINK (version 4.0P).

En la **Tabla 6** se resumen las técnicas de genética molecular empleadas en el estudio de cada familia.

Tabla 6. Técnicas de genética molecular empleadas en el estudio de cada familia
--

Familia AAE	1- Análisis de ligamiento 2-Secuenciación directa del ADN mitocondrial (III-2, III-7, II-5) 3-Análisis RFLP 4-Análisis SSCP
Familia EIG-24	1-Secuenciación directa del gen <i>GABRG2</i> (fenotipo predominante CF + y ausencias) 2- Análisis de ligamiento de regiones candidatas asociadas a GEFS + [19q13 (<i>SCN1B</i>) y 2q24 (<i>SCN1A</i> y <i>SCN2A</i>)], crisis febriles [8q13-21, 19p13 y 5q14] y loci relacionados con genes codificantes del canal sodio cerebral [3p21-24, 11q23 y 12q13] 3- Secuenciación del gen <i>SCN1A</i> (II-3, II-7, II-9 y II-13). 4- Análisis SSCP 5- Análisis funcional de la mutación
Familia ED-HP	1- Secuenciación directa del gen <i>FLNA</i> (II-2, III-2, IV-1) 2- Análisis RFLP del exón 3 con el enzima de restricción <i>Hae III</i> en todos los individuos (afectos y sanos) de la familia 3-Análisis SSCP en 92 individuos sanos

4. RESULTADOS

Se describen a continuación los resultados del análisis clínico y molecular de las familias estudiadas.

4.1 FAMILIA AAE

4.1.1 Análisis clínico

4.1.1.1 Características del árbol genealógico

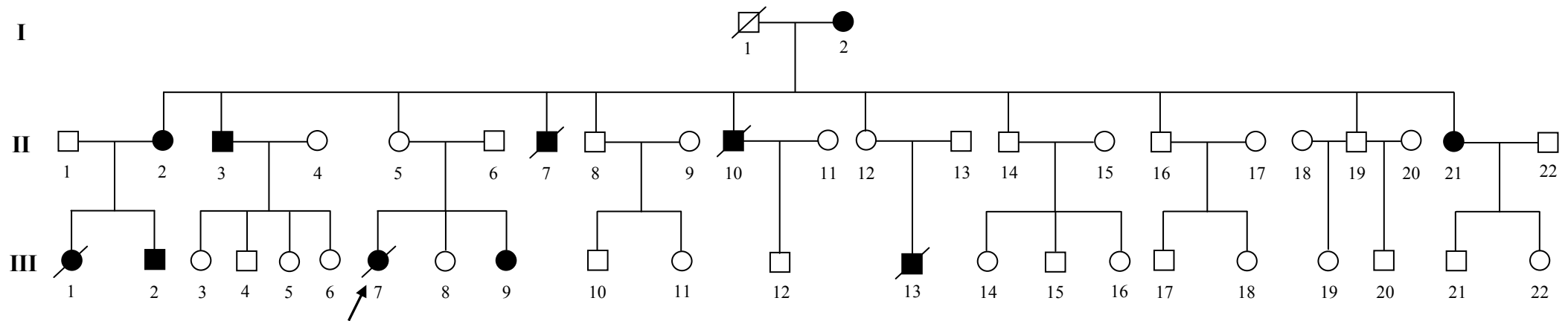
Se trata de una familia de origen gallego no consanguínea, constituida por 46 individuos incluyendo 11 afectados de epilepsia distribuidos a lo largo de tres generaciones. Entre los individuos afectados de epilepsia 6 fueron mujeres y 5 varones. De los 20 individuos identificados como portadores únicamente 11 expresaron la enfermedad lo que indica una penetrancia incompleta (~55%). Solo las mujeres (afectas y portadoras) transmitieron la enfermedad a su descendencia, lo que es consistente con un modo de herencia materna/mitocondrial. En la **figura 4** se muestra un esquema del árbol genealógico.

4.1.1.2 Características clínicas y fenotipo de los pacientes

La epilepsia en esta familia mostró una heterogeneidad clínica y una expresividad variable. La edad de inicio se situó preferentemente en la adolescencia y comienzo de la edad adulta. La epilepsia se caracterizó por la presencia de crisis focales motoras versivas, crisis generalizadas tónico-clónicas y mioclonias con una marcada fotosensibilidad. Los electroencefalogramas mostraron anomalías epileptiformes focales (temporales y/o temporo-rolándicas) y generalizadas. Las pruebas de imagen realizadas (TC y RM cerebrales) no mostraron lesiones focales a excepción de un individuo (III-13). Cinco individuos afectados en la segunda y tercera generación fallecieron; tres de ellos en relación con complicaciones de la epilepsia y el cuarto sin causa conocida (aunque muy probablemente en relación también con la epilepsia).

A continuación se describen las historias clínicas de los pacientes. Se comienza la descripción de la paciente índice y posteriormente de los sujetos afectados en orden descendente (generaciones I a III) y de izquierda a derecha (1,2...) de acuerdo con el árbol genealógico. Las características clínicas se resumen en la **tabla 7**.

Fig 4. Familia AAE



Paciente III-7 (probando)**Historia clínica:**

La epilepsia comenzó a los 9 años de edad con sacudidas mioclónicas de ambas extremidades superiores de predominio matutino, sensibles a los cambios de luz y a la falta de sueño. A los 11 años presentó la primera crisis generalizada tónico-clónica durante el sueño. Entre los 11 y los 19 años las crisis se presentaron de forma muy esporádica. A partir de esta edad, el cuadro clínico empeora: aumentan las mioclonías, aparecen mioclonías palpebrales y crisis clónicas versivas muy frecuentes. Según describía la paciente las crisis se iniciaban con dilatación pupilar, fotofobia y visión borrosa seguidas de mioclonías palpebrales, giro de la cabeza y cuello hacia la izquierda y sacudidas clónicas de ojos, cara y cabeza en la misma dirección, sin alteración de conciencia. Estas crisis aparecían de forma refleja ante estímulos luminosos cotidianos tales como encender las luces del dormitorio y cedían en la oscuridad. Empeoraban en días muy soleados y en las épocas del año más luminosas, precisando protección continua en estos periodos con gafas de sol y visera. Las crisis versivas tendían a presentarse agrupadas en acúmulos de hasta varias horas de duración llegando a ocasionar múltiples ingresos hospitalarios por estados epilépticos parciales de muy difícil control. Se ensayó tratamiento con múltiples fármacos en combinación incluyendo ácido valproico, lamotrigina, topiramato, clonazepam, fenobarbital, fenitoina y levetiracetam, sin mejoría. La probando falleció a los 34 años de edad en el contexto de un estatus epiléptico prolongado de varios meses de duración, refractario a múltiples tratamientos.

Exploración neurológica:

En la exploración neurológica se observó un temblor fino postural en ambas manos y cefálico. No se evidenció ataxia ni otras alteraciones.

Pruebas complementarias:

El electroencefalograma interictal mostró una actividad de fondo en vigilia lenta y pobremente organizada, caracterizada por un ritmo alfa posterior lento entremezclado con elementos theta y delta difusos y por una escasa diferenciación antero-posterior del trazado. Durante el sueño se observó una estructuración deficiente de los elementos y fases fisiológicas del sueño. Se observaron anomalías epileptiformes focales en forma de ondas agudas, puntas, brotes de polipunta y polipunta-onda a < 3 Hz en ambas regiones temporales de máxima expresión temporo-rolándica derecha y descargas de polipunta-onda generalizada (**Figura 5a, 5b**). Las anomalías epileptiformes se incrementaron durante el sueño. El electroencefalograma ictal durante un estado epiléptico mostró descargas generalizadas de punta-onda y polipunta-onda prácticamente continua alternando con periodos breves de supresión de la actividad. En otro estado epiléptico se observó una actividad rítmica de puntas a nivel frontocentral bilateral (**Figura 5c**). La estimulación luminosa intermitente (ELI) especialmente a 14 Hz desencadenó una respuesta fotoparoxística en el EEG junto con crisis mioclónicas y crisis generalizadas tónico-clónicas.

La RM cerebral no mostró anomalías significativas.

El estudio neuropsicológico detectó un déficit discreto de funciones cognitivas, especialmente en capacidad mnésica, orientación temporo-espacial y comprensión-expresión del lenguaje oral. El cociente intelectual global según test estandarizados (WAIS) fue de 80.

La determinación de ácido láctico mostró un valor normal en ayunas con incremento de 90% tras la ingesta. El ácido pirúvico apareció ligeramente elevado en ambas determinaciones.

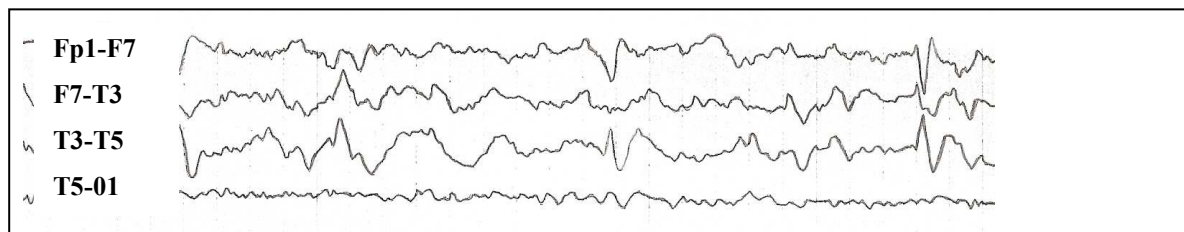
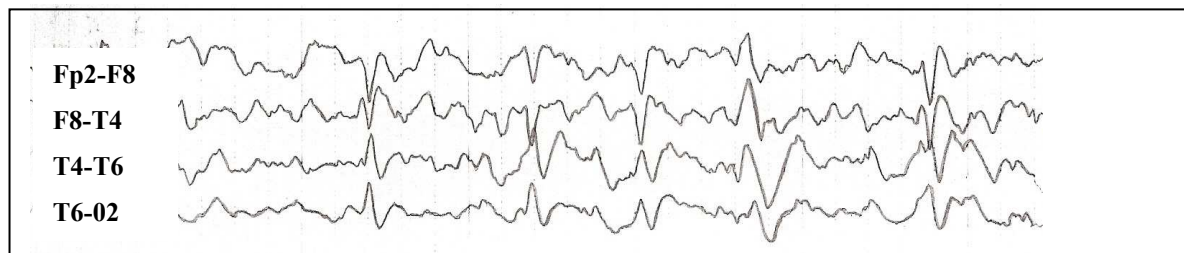


Figura 5a. Individuo III-7. EEG interictal que muestra ondas agudas y puntas en ambas regiones temporales

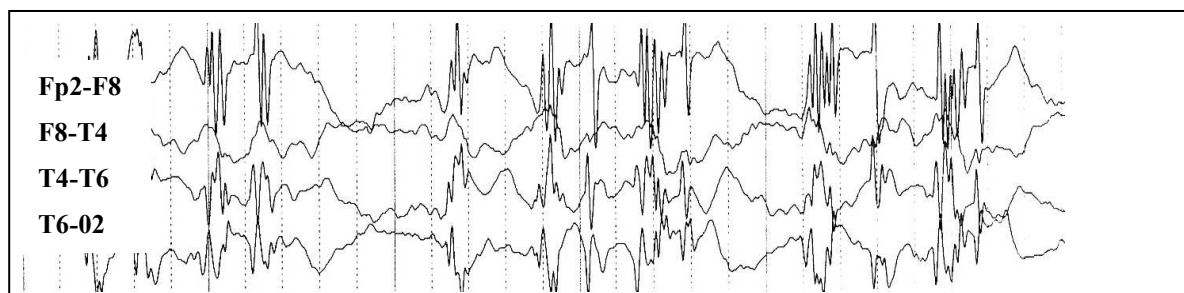


Figura 5b. Individuo III-7. EEG interictal en el que se observan brotes de polipunta y polipunta-onda hemisféricas derechas.

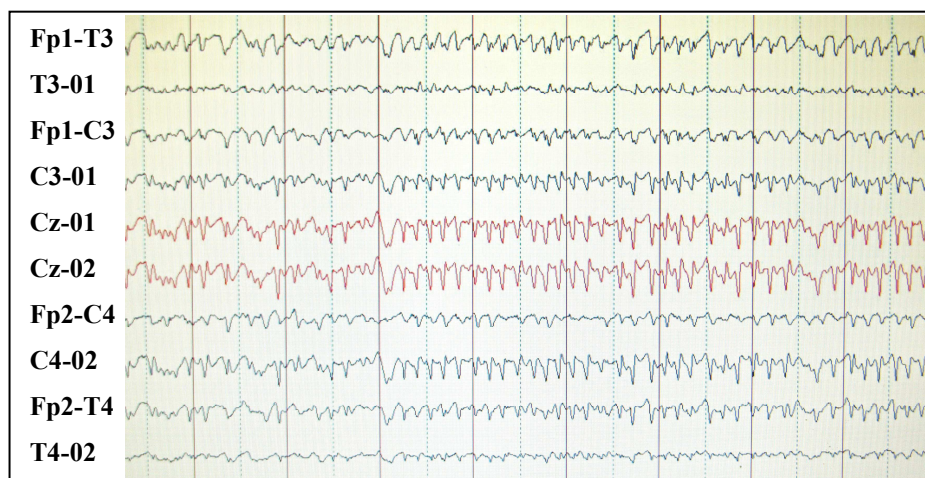


Figura 5c. Individuo III-7. EEG ictal durante un estado epiléptico en el que se observa una actividad rítmica de puntas a nivel frontocentral bilateral

Paciente I-2***Historia clínica***

Es la abuela materna de la probando. Su edad en el momento del estudio es de 81 años. Tuvo tres hermanos varones; uno de ellos falleció por un accidente cerebrovascular del que se desconocen más datos y los otros dos están vivos, siendo uno de ellos portador de una sordera de etiología no filiada. No se conocen otros problemas médicos en la familia.

Comenzó a los 62 años con sacudidas involuntarias descritas por la propia paciente como “sobresaltos” y “parpadeo” en relación con estímulos luminosos. Estos episodios, sugerentes de mioclonias, afectaban a ambas extremidades superiores y ocurrían en salvas. A los 65 años presentó crisis generalizadas tónico-clónicas sin relación con estímulos luminosos. Fue diagnosticada de meningioma frontal izquierdo del que se intervino. Desde la cirugía no ha vuelto a presentar crisis generalizadas tónico-clónicas, sin embargo las mioclonias persisten con una frecuencia diaria. Esta paciente presentó además un hematoma cerebral intraparenquimatoso de probable origen hipertensivo.

Exploración neurológica

El examen neurológico mostró un temblor de reposo y postural en ambos miembros superiores y en la cabeza.

Pruebas complementarias

No se dispone de estudio electroencefalográfico de esta paciente.

Paciente II-2***Historia clínica***

Tiene en el momento de este estudio 59 años, es hija de la paciente anterior, madre de los pacientes III-1 y III-2 y tía materna de la probando. Presentó un solo episodio a los 10 años de edad en el que, según su propio relato, notó de forma brusca rigidez en ambos brazos, con los dedos hiperextendidos, era incapaz de hablar, perdió el conocimiento y cayó al suelo. Recuperó el conocimiento en unos minutos aunque permaneció confusa durante más tiempo. No refiere otros episodios sugerentes de crisis.

Exploración neurológica

La exploración neurológica mostró una ptosis palpebral izquierda y una alteración de la mirada conjugada superior al parecer congénita, de etiología no filiada.

Pruebas complementarias

El electroencefalograma interictal mostró una lentificación difusa de la actividad de fondo y descargas epileptiformes en forma de puntas en la región temporal posterior izquierda.

No se dispone de estudio de imagen cerebral en esta paciente.

Paciente II-3***Historia clínica***

Hermano de la paciente anterior, tiene en el momento del estudio 50 años. Presentó varios episodios (entre 3 y 4 en total) de desconexión del medio con automatismos orales y manuales compatibles con crisis parciales complejas. Durante estos episodios la familia describía que “se comportaba como si no viera” “movía la boca como si tuviera sed” y “se frotaba las manos”. Algunos de

los episodios se siguieron de giro de la cabeza y convulsiones generalizadas. No presentó mioclonias ni fotosensibilidad. Este paciente fue diagnosticado además de un trastorno de ansiedad.

Exploración neurológica

La exploración neurológica fue normal.

Pruebas complementarias

No disponemos de pruebas de imagen ni de electroencefalogramas.

Paciente II-7

Historia clínica

Hermano de los dos pacientes anteriores. Entre los antecedentes destacan un etilismo crónico desde los 16 años, traumatismos craneoencefálicos múltiples y crisis generalizadas tónico-clónicas desde los 18 años. Se desconocen más datos clínicos acerca de su epilepsia. Presentó además una sordera desde los 30 años de edad de origen desconocido. No se dispone de pruebas complementarias ya que el paciente no recibió atención neurológica. Falleció en su domicilio sin que se conozca la causa. No se realizó estudio de autopsia.

Paciente II-10

Historia clínica

Hermano de los tres pacientes anteriores. Falleció a la edad de 40 años. Entre sus antecedentes personales destacaba la aparición de una hipoacusia neurosensorial progresiva desde los 20 años de edad de etiología no filiada y migrañas. A los 18 años de edad comenzó con mioclonias palpebrales en relación con estímulos luminosos. La familia describe cómo “le palpitaban los ojos” ante luces intensas. La simple exploración del reflejo fotomotor en la consulta desencadenaba una salva de estas mioclonias. A los 27 años comenzó con crisis focales versivas precedidas de sensación de mareo y visión borrosa, con giro y sacudidas clónicas de la cabeza hacia la izquierda, elevación y extensión de miembro superior izquierdo en postura de esgrima seguidas de convulsiones generalizadas. Las crisis se presentaban en acúmulos, con frecuencia durante horas e incluso días, requiriendo numerosos ingresos hospitalarios debido a estados epilépticos parciales. Recibió tratamiento con múltiples fármacos antiepilépticos en politerapia (carbamacepina, difenilhidantoína, ácido valproico, fenobarbital, clonazepam, vigabatrina y gabapentina), sin eficacia. Además este individuo presentó desde los 20 años episodios de caída al suelo con intensa agitación psicomotriz, movimientos de lucha y autoagresión, de 10 a 30’ de duración, con una frecuencia de 1-2 episodios al año, que fueron diagnosticados de reacciones de conversión. El paciente desarrolló un deterioro cognitivo y motor progresivo. En las últimas revisiones el lenguaje se había reducido a monosílabos y era incapaz de vestirse y asearse sin ayuda. Este paciente falleció a los 40 años de edad durante un ingreso por un estado epiléptico complicado con un tromboembolismo pulmonar masivo. Se realizó un estudio de autopsia que no fue concluyente.

Exploración neurológica

La exploración neurológica mostró un temblor postural en ambas manos, hipertonía de las cuatro extremidades, arreflexia de miembros inferiores y un reflejo cutáneo-plantar indiferente bilateral.

Pruebas complementarias

En la analítica de sangre se detectó un ácido láctico de 32,7 mg/dl (normal <19 mg/dl). Se practicó una biopsia muscular que fue estudiada al microscopio óptico y electrónico y que no mostró alteraciones. No se realizó en aquel momento estudio de cadena respiratoria mitocondrial. Los potenciales evocados visuales mostraron un aumento de latencia bilateral mientras que los potenciales evocados auditivos revelaron un aumento de las latencias I-III y I-IV en el oído izquierdo. Un electroretinograma realizado fue sugestivo de retinopatía.

El EEG interictal mostró una lentificación difusa de la actividad de fondo y anomalías epileptiformes en forma de descargas de polipunta y polipunta-onda generalizada de máxima expresión en regiones occipitales.

La RM cerebral reveló una atrofia cerebral difusa moderada.

El estudio de autopsia no fue concluyente. El análisis anatomopatológico del tejido cerebral mostró como único hallazgo destacable una pérdida neuronal difusa en la corteza cerebral y un acúmulo de lipofusina de carácter inespecífico.

Paciente II-21***Historia clínica***

Hermana menor de los cuatro pacientes anteriores, tiene 34 años de edad en el momento del estudio. Padece de migrañas y dudosas crisis de inicio a los 26 años. La paciente describe que se quedaba sin vista durante unos minutos. Ante la sospecha de crisis epilépticas estuvo en tratamiento con fenobarbital que abandonó voluntariamente sin ninguna repercusión. No disponemos de más datos que confirmen el diagnóstico de epilepsia. Por otro lado los episodios transitorios de pérdida de visión podrían tratarse de auras visuales de migraña.

Exploración neurológica

La exploración neurológica fue normal

Pruebas complementarias

Los electroencefalogramas interictales fueron normales. Un electroencefalograma realizado durante uno de los episodios mostró ondas lentas difusas sin anomalías epileptiformes asociadas.

La RM cerebral fue normal.

Paciente III-1***Historia clínica***

Se trata de la prima de la probando y hermana mayor del individuo III-2 (también afecto). Tiene 31 años en el momento del estudio. Entre los antecedentes personales consta un parto prolongado sin complicaciones. El desarrollo psicomotor fue normal. Tuvo su primera crisis generalizada tónico-clónica a los 21 años de edad. Entre los 21 y los 24 años presentó varias crisis convulsivas que se precedieron de visión borrosa y sensación epigástrica ascendente. A los 24 años comenzó con mioclonias palpebrales (“como un parpadeo continuo”) y mioclonias de ambas extremidades superiores que se desencadenaban con los cambios de luz. En ocasiones las mioclonias palpebrales se seguían de una crisis generalizada tónico-clónica. Desde los 27 años presentó además episodios de desviación oculocefálica a la derecha y movimientos clónicos de la cabeza en la misma dirección sin pérdida de conocimiento asociada. Estas

crisis eran breves, aparecían en vigilia durante el día y cedían al apagar la luz y dormirse. La paciente desarrolló un trastorno ansioso-depresivo desde el diagnóstico de la enfermedad.

Exploración neurológica

La exploración neurológica mostró un temblor fino distal de ambas manos de carácter postural y un trastorno oculomotor no bien caracterizado, con alteración de la mirada conjugada en varias posiciones, sin claras paresias ni restricciones.

Pruebas complementarias

El EEG mostró una actividad de fondo lenta y discretamente desestructurada. Se observaron descargas de ondas agudas y puntas en ambas regiones temporales de predominio izquierdo con tendencia a la generalización. Durante la ELI se desencadenó una crisis clínica con mioclonias palpebrales y masivas con correlato de descargas de polipunta-onda generalizada en el trazado.

El TC cerebral no mostró anomalías.

Evolución clínica

A los 35 años presentó un estado epiléptico desencadenado por el consumo de cocaína con crisis parciales complejas y crisis secundariamente generalizadas continuas. El electroencefalograma al ingreso mostró una actividad ictal de punta y polipunta onda generalizada. La paciente fue trasladada a la unidad de cuidados intensivos (UCI) donde se indujo un coma barbitúrico y se añadieron múltiples fármacos (midazolam, benzodiacepinas, ácido valproico, fenobarbital, fenitoina, carbamacepina, levetiracetam y topiramato) sin mejoría. La paciente entró en situación de estado epiléptico subintrante que se prolongó durante más de dos meses. La RM cerebral inicial mostró lesiones hiperintensas córtico-subcorticales que mejoraron en un control posterior y que se interpretaron secundarias al edema cerebral causado por las crisis. Durante su ingreso en UCI (más de 6 meses) presentó tres cuadros sépticos. La paciente fue trasladada en estado de coma a la planta de neurología donde presentó un nuevo cuadro séptico con fallo multiorgánico que fue causa de exitus. No se realizó estudio de autopsia.

Paciente III-2

Historia clínica

Paciente que presenta en el momento del estudio 35 años. La epilepsia comenzó a los 17 años con mioclonias de la cabeza (en gesto de afirmación) y mioclonias palpebrales, seguidas poco tiempo después de crisis generalizadas tónico-clónicas especialmente en relación con los cambios de luz. A los 18 años se añaden crisis versivas consistentes en giro forzado de los ojos, cabeza y tronco hacia la izquierda seguidas de una postura tónica asimétrica del miembro superior izquierdo. Estas crisis tendían a agruparse desembocando en crisis generalizadas tónico-clónicas recurrentes y estados epilépticos parciales. Desde los 20 años presenta además mioclonias masivas que ocasionan imposibilidad para comer de forma autónoma y frecuentes caídas. Se describen además episodios de mirada fija e inclinación del cuerpo hacia uno u otro lado que fueron interpretados como eventos no epilépticos. Se ensayaron numerosos fármacos (fenobarbital, difenilhidantoina, carbamacepina, ácido valproico, topiramato, lamotrigina, levetiracetam, clonacepam y piracetam), en combinaciones de hasta cuatro y cinco medicamentos, sin lograr un control de las crisis. El ácido valproico indujo una mejoría parcial de la epilepsia, mientras que la lamotrigina y la carbamacepina empeoraron las mioclonias.

Exploración neurológica

Se observó un retraso psicomotor leve. La exploración de pares craneales fue normal a excepción de un ojo vago izquierdo. El resto de examen neurológico fue normal. Se apreciaron abundantes mioclonias de predominio distal en miembros superiores presentes en reposo, que aumentaron al mantener una postura y durante el movimiento.

Pruebas complementarias

El EEG interictal mostró una actividad de fondo en vigilia lenta (activ alfa 7,5-8 Hz entremezclada con ondas delta y theta) y desorganizada. Se observaron anomalías epileptiformes en forma de ondas agudas, puntas, descargas de punta-onda y polipunta-onda en ambas regiones temporales y fronto-rolándicas de predominio izquierdo (**figura 6**). El electroencefalograma ictal durante una crisis versiva mostró una actividad seudorítmica de ondas lentas delta polimorfas en la región fronto-rolándica derecha. (**figura 7**). La ELI desencadenó descargas de polipunta-onda generalizada que se correlacionaron con crisis mioclónicas en un registro. La RM cerebral y un SPECT interictal fueron normales.

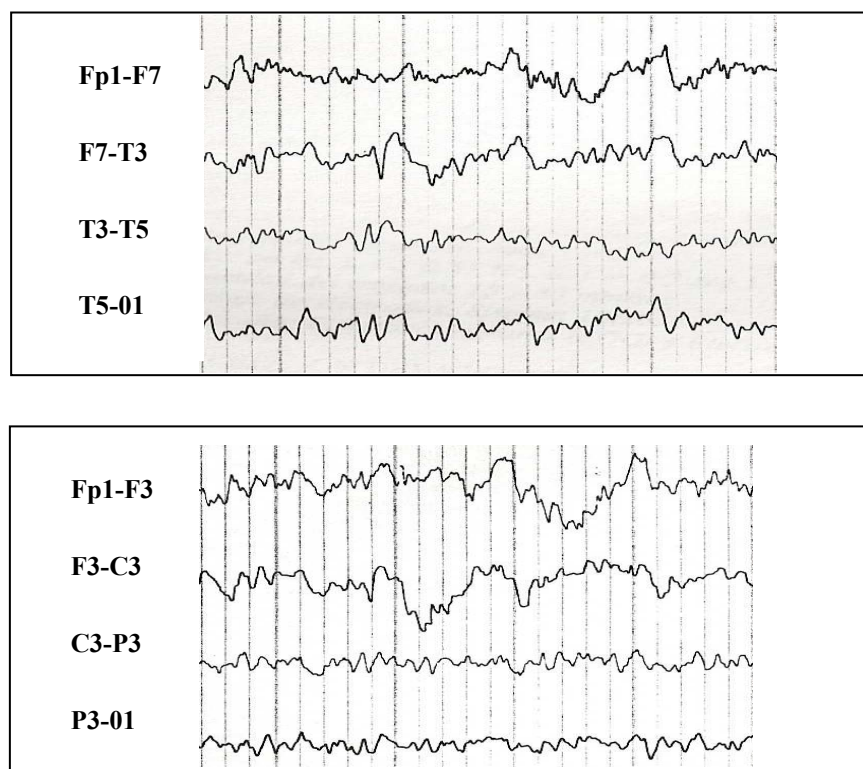


Fig 6. Individuo III-2. EEG interictal. Ondas agudas en la región temporo-rolándica izquierda.

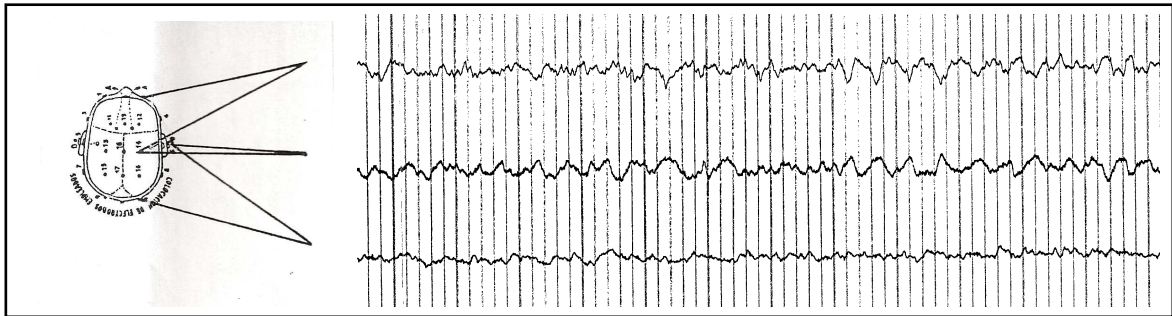


Fig 7 . Individuo III-2. EEG ictal que muestra una actividad seudorítmica de ondas delta polimorfas en la región rolándica derecha.

Paciente III-9

Historia clínica

Es la hermana menor de la probando y tiene en el momento del estudio 27 años. Entre los antecedentes personales destacan mal rendimiento escolar y migrañas. A los 8 años, en base a los antecedentes familiares, se realizó un electroencefalograma en el que se detectaron anomalías epileptiformes por lo que se decidió iniciar tratamiento con ácido valproico, el cual se retiró posteriormente ante la ausencia de crisis. A los 9 años aparecieron mioclonías de brazos y de la cabeza, de predominio matutino, desencadenadas ante estímulos visuales y cambios bruscos de luz tales como ver los rayos del sol a través de los árboles o ver la televisión. Estas mioclonías aumentaron con la edad. A los 14 años, coincidiendo con la estimulación luminosa intermitente realizada durante un EEG de rutina presentó una única crisis generalizada tónico-clónica. Se inició tratamiento con fenobarbital que se suspendió tras presentar un síndrome de Stevens-Johnson sustituyéndose por ácido valproico.

Exploración neurológica

La exploración neurológica mostró un temblor de baja amplitud postural y cinético en ambas extremidades superiores. El resto de la exploración neurológica fue normal.

Pruebas complementarias

El EEG interictal mostró una actividad de fondo lenta (ritmo posterior a 6-7 Hz) y discretamente desestructurada junto con anomalías epileptiformes focales en forma de puntas hemisféricas izquierdas y descargas de punta-onda generalizada. La fotoestimulación intermitente desencadenó una respuesta fotoparoxística y la única crisis generalizada tónico-clónica que presentó la paciente.

El resto del estudio neurofisiológico incluyendo potenciales evocados visuales y auditivos, un electromiograma y un electroneurograma fueron normales.

La RM cerebral fue normal.

El ácido láctico basal fue normal en una primera determinación y discretamente elevado en una segunda determinación con un incremento medio del 70% tras estímulo de ingesta. El ácido pirúvico presentó un leve incremento basal y post-ingesta. Ante la sospecha por la historia familiar de una epilepsia mioclónica progresiva secundaria a una citopatía mitocondrial se realizó una biopsia muscular del músculo deltoides. El estudio al microscopio óptico y electrónico no mostró hallazgos significativos. No se observaron fibras rojo-rasgadas. La tinción COX (que identifica el complejo IV de la cadena

respiratoria) fue normal. El estudio bioquímico de complejos de la cadena respiratoria en homogenado muscular mostró un complejo IV (citocromo C oxidasa) descendido: 17,2 U/CS (normal: 76,9±41). La búsqueda de mutaciones puntuales asociadas a MERFF fue negativa. Se ensayó tratamiento con L-carnitina, riboflavina y tiamina sin mejoría.

Paciente III-13

Historia clínica

Este paciente es primo hermano de la probando y falleció a los 7 años de edad. Entre los antecedentes personales destaca un parto prematuro a las 30 semanas y bajo peso al nacimiento. Se desconoce si sufrió hipoxia perinatal. A los 2 meses de edad ingresó por un cuadro de irritabilidad, llantos continuos y vómitos. El examen clínico reveló una microcefalia asociada a rasgos dismórficos (pabellones auriculares de implantación baja, frente plana con inclinación posterior y macroglosia) y a una tetraparesia espástica severa. El TAC craneal mostró una atrofia cerebral cortical y subcortical difusa junto con una porencefalia extensa de la que se desconocen más detalles. Las pruebas complementarias realizadas incluyendo el análisis del líquido cefalorraquídeo, serología de infecciones antenatales, screening de enfermedades metabólicas y un examen sistémico completo fueron normales.

A la edad de 12 meses se evidenció un retraso motor severo; el paciente presentaba un sostén cefálico incompleto y era incapaz de mantener la sedestación. En el EEG realizado se observó un trazado lento y mal organizado junto con la presencia casi continua de anomalías epileptiformes difusas. El paciente fue diagnosticado de tetraparesia espástica y encefalopatía connatal de etiología indeterminadas.

Según describe la madre presentó desde los 2 años episodios consistentes en desviación oculocefálica hacia la izquierda junto con sacudidas clónicas de la cabeza y de los ojos en la misma dirección. La descripción de estos episodios fue muy similar a la de las crisis observadas en sus primos, no mostraban influencia por los cambios de luz, eran muy frecuentes (varias veces al día) incluso continuas durante periodos de varios días. Este paciente falleció a los 7 años en relación con un posible estatus epiléptico complicado con una infección respiratoria. No se realizó estudio de autopsia.

Tabla 7. Familia AAE. Características clínicas de los pacientes

Indiv	Edad actual	Edad inicio	Crisis inicio	Tipo de crisis	Semiología de las crisis focales	Estado epiléptico	FotoS	Exploración neurológica	Otros hallazgos	EEG	RM/TC
III-7	Ø	9a	Mio	Mio, CPS, CPSG	Mioclónicas palpebrales, versión oculocefálica y sacudidas clónicas de la cabeza hacia la izqda	+	+++	RPM	Temblor	P, PP Tempororolandica bilateral PPO generalizada	Normal
I-2	80a	62a	Mio	Mio, CGTC	-	-	++	Normal	Temblor	No disponible	Meningioma frontal izqdo Hematoma cerebral
II-2	58a	10a	CPSG	CPSG	Extensión de ambos MMSS, pérdida del habla y pérdida de conocimiento	-	-	-	Oculomotor Ptosis	P Temporal izqda	No disponible
II-3	45a	?	CPC	CPC, CPSG	Desconexión, automatismos orales y manuales	-	-	Normal	-	No disponible	No disponible
II-7	Ø	18a	CGTC	CGTC	-	?	?	?	Hipoacusia	No disponible	No disponible
II-10	Ø	18a	Mio	Mio, CPS, CPSG	Versión oculocefálica, clonias faciales izqdas y postura tónica de MSI	+	+++	Deterioro cognitivo	Hipoacusia Retinopatía Migraña	P y PPO generalizadas	Atrofia cerebral
II-21	-	-	-	-	-	-	-	-	Migraña	-	-
III-1	Ø	21a	CGTC	CGTC, Mio, CPS CPSG	Versión oculocefálica y sacudidas clónicas de la cabeza hacia la derecha	+	++	Normal	Oculomotor Temblor	P Temporales bilaterales PPO generalizada	Normal
III-2	35a	17a	Mio	Mio, CPS, CPC, CGTC	Versión oculocefálica y tronco hacia izqda y postura tónica asimétrica de MSI	+	+++	RPM	-	P, PO, PPO Tempororolandica bilateral	Normal
III-9	27a	9a	Mio	Mio, CGTC	-	-	++	RPM	Temblor Migraña	P hemisférica izqda PO generalizada	Normal
III-13	Ø	2a	CPS	Mio, CPS	Sacudidas clónicas versivas	+	-	RPM Tetraparesia espástica	-	P generalizada	Atrofia cerebral Porencefalia

Bilat: bilaterales, **CGTC:** Crisis generalizadas tónico-clónicas, **CPC:** Crisis parciales complejas, **CPS:** Crisis parciales simples, **CPSG:** Crisis parciales secundariamente generalizadas, **FotoS:** Fotosensibilidad, **Gen:** Generalizada, **Indiv:** Individuo, **Mio:** crisis mioclónicas, **MioP:** mioclónicas palpebrales, **P:** Punta, **PP:** polipunta, **PPO:** polipunta-onda, **P biT:** Puntas bitemporales, **RPM:** Retraso psicomotor, **TD:** Temporal derecha, **TI:** Temporal izquierda, **Ø:** Fallecido

4.1.2 Análisis molecular

Para el análisis molecular se extrajo ADN a partir de sangre periférica o tejido cerebral de 21 individuos de la familia: 8 afectados (individuos I-2, II-2, II-3, II-21, III-1, III-2, III-7 y III-9) y 13 sanos (individuos II-1, II-4, II-5, II-6, II-8, II-12, II-14, II-16, III-3, III-4, III-5, III-6 y III-8).

Inicialmente se consideró un modo de herencia autosómico dominante. Sin embargo el descubrimiento de que uno de los individuos considerado afecto (III-6) no lo era en realidad planteó un nuevo enfoque diagnóstico. Clínicamente el cuadro familiar presentaba rasgos sugerentes de un trastorno mitocondrial (epilepsia mioclónica refractaria asociada a retraso psicomotor, migrañas y sordera neurosensorial) y al revisar el árbol genealógico se comprobó que era compatible con un modo de herencia materno. Por este motivo se decidió analizar el ADN mitocondrial mediante secuenciación directa completa en el individuo III-2 (primo de la probando). El análisis de secuenciación (**Figura 8**) permitió detectar una variación no descrita hasta el momento consistente en un cambio de nucleótido a nivel del residuo 5793 (**5793A>G**) en el gen codificante para ARN de transferencia de cisteína mitocondrial (**TRNC**). Esta variación fue identificada como homoplásmica por secuenciación sin poder descartarse la presencia de heteroplasmas inferiores al 30%. Además de esta variación se identificaron 14 cambios en genes mitocondriales (*MT-RNR1*, *MT-RNR2*, *MT-ND2*, *MT-CO2*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, *MT-CYB* y *MT-DLOOP*), todos ellos considerados como polimorfismos sin repercusión funcional. La variación 5793A>G fue comprobada mediante secuenciación directa en los individuos II-5 (madre de la probando, portadora), II-6 (padre de la probando, sano) y III-7 (probando).

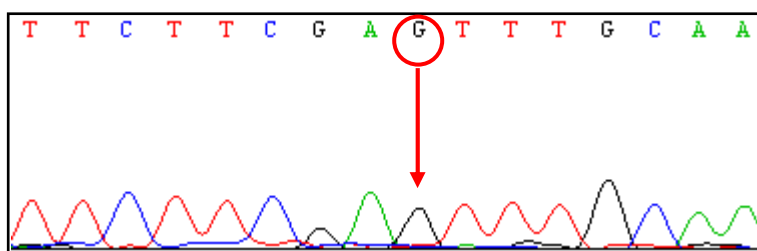
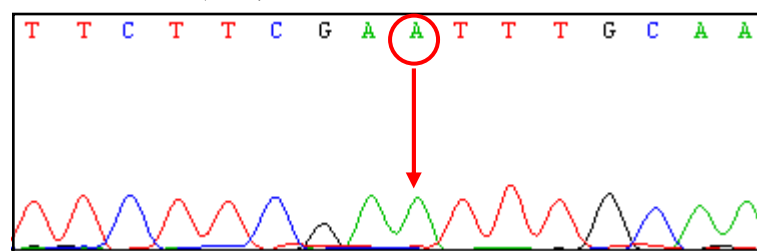
a. Individuo III-7 (probando)*b. Individuo II-5 (sano)*

Fig 8. Análisis de la mutación 5793A>G en: a. probando (III-7) y b. padre sano de la probando (II-5).

El siguiente paso fue realizar un análisis de segregación mediante RFLPs en todos los individuos tanto portadores (afectos y asintomáticos) como no portadores. El análisis de RFLPs mostró una sola banda de 137 pb indicando una pérdida del sitio de restricción del enzima en todos los individuos afectados y/o portadores de la mutación. Este hallazgo permitió además confirmar la homoplasmia en todos los individuos portadores del cambio. Por el contrario, los individuos sanos conservaron activo el sitio de restricción del enzima, lo cual se tradujo en la detección de dos bandas de 67 y 70 pb. La autenticidad del fragmento analizado fue confirmada mediante secuenciación de la banda extraída a partir del gel de agarosa. **Figura 9**

Por último los resultados del análisis de RFLPs fueron cotejados con un análisis de polimorfismos en la conformación de cadenas sencillas del ADN o SSCP (Dra. Guerrero López, Laboratorio de Genética de las Epilepsias, Fundación Jiménez Díaz).

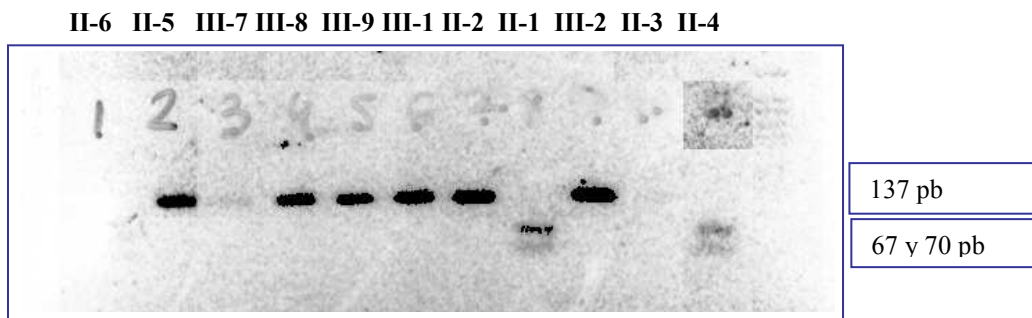


Fig 9. Análisis RFLPs. Las números corresponden a los siguientes individuos: 1(II-6), 2(II-5), 3(III-7), 4(III-8), 5(III-9), 6(III-1), 7(II-2), 8(II-1), 9(III-2), 10(II-3), 11(II-4). La banda de 137 pb corresponde a los individuos portadores de la mutación 5793A>G mientras que la doble banda (67 y 70 pb) corresponde a los individuos sanos que conservan el sitio de restricción del enzima. Imagen cedida por la Dra. Guerrero López, Laboratorio de Genética de las Epilepsias, Fundación Jiménez Díaz.

4.2 FAMILIA EIG-24

4.2.1 Análisis clínico

4.2.1.1 Características del árbol genealógico

Se trata de una familia constituida por 69 individuos distribuidos a lo largo de cuatro generaciones en la que se identificaron 22 individuos afectados de epilepsia. Entre los individuos afectados 14 fueron mujeres y 8 varones. Se encontraron epilépticos de ambos sexos en las cuatro sucesivas generaciones. El modo de herencia fue compatible con una herencia autosómico dominante (figura 10).

4.2.1.2 Características clínicas y fenotipo de los pacientes

Entre los 22 sujetos con epilepsia 17 presentaron un fenotipo compatible con el diagnóstico de epilepsia generalizada familiar con crisis febriles plus (GEFS +) mientras que en 5 individuos la información clínica disponible no fue suficiente para clasificar la epilepsia. Las características clínicas de los familiares afectados se resumen en la tabla 6.

Crisis febriles plus (CF +):

Fue el fenotipo más frecuente, presente en 6 pacientes (II-3, II-9, III-6, III-8, III-14 y IV-1), cuyas historias clínicas resumidas son las siguientes:

Individuo II-3

Se trata de la hermana mayor del probando, tiene 61 años en el momento del estudio. Presentó 3 crisis febriles en la infancia, la última a los 7 años de edad. No ha presentado en la edad adulta crisis

generalizadas tónico-clónicas ni episodios compatibles con ausencias o mioclonias. La exploración neurológica fue normal. Un electroencefalograma interictal realizado a los 23 años no mostró anomalías.

Individuo II-9

Es hermana del probando y tiene 53 años en el momento del estudio. Presentó su primera crisis generalizada tónico-clónica con fiebre a los 8 años de edad, tuvo entre 5 y 10 crisis febriles típicas seguidas de crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles que persisten en la actualidad. Ha seguido tratamiento con fenobarbital, difenilhidantoína, topiramato, ácido valproico y combinaciones de estos fármacos con una eficacia parcial. No ha presentado episodios compatibles con ausencias o mioclonias. La exploración neurológica fue normal. El electroencefalograma mostró descargas de punta-onda generalizada irregular a 3-3,5 Hz sobre un trazado de fondo normal. La RM cerebral fue normal.

Individuo III-6

Se trata del sobrino del probando, tiene 36 años en el momento del estudio. Tuvo varias crisis febriles típicas; la primera de ellas a los 3 años de edad y la última en la edad adulta. Las crisis febriles se sucedieron de crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles esporádicas en el contexto de cansancio físico intenso. En total ha presentado entre 10 y 12 crisis generalizadas tónico-clónicas febriles y afebriles. Estuvo en tratamiento con ácido valproico hasta hace 8 años momento en que se suspendió por voluntad del paciente, que se encuentra en la actualidad libre de crisis. El examen neurológico fue normal. Se realizó un electroencefalograma interictal y un TC craneal que fueron normales.

Individuo III-8

Paciente de 33 años, sobrina del probando. Presentó una convulsión febril a los 3 años de edad y 2 episodios más de pérdida de conocimiento en contexto de fiebre a los 4 y 6 años de edad. Estuvo asintomática hasta los 31 años cuando presentó 3 crisis generalizadas tónico-clónicas coincidiendo con un periodo de calor y de gran cansancio físico. Desde entonces no ha vuelto a presentar ninguna crisis. Esta paciente tuvo varios intentos de suicidio. Fue diagnosticada de un trastorno límite de personalidad del que no se conocen más datos. Recibió tratamiento con carbamacepina por ambos trastornos (como fármaco antiepiléptico y como fármaco estabilizador del ánimo). La exploración neurológica fue normal. El TC craneal y electroencefalograma interictal no mostraron anomalías.

Individuo III-14

Se trata de un sobrino del probando, de 24 años en el momento del estudio. Presentó 2 crisis generalizadas tónico-clónicas febriles antes de los 6 años de edad y 2 crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles en relación con privación de sueño y ejercicio físico intenso en la adolescencia. No ha recibido ningún tratamiento antiepiléptico. La exploración neurológica fue normal. Las pruebas complementarias (electroencefalograma y TC craneal) no mostraron alteraciones.

Individuo IV-1

Paciente que presenta en el momento del estudio 4 años de edad. Tuvo varios episodios de crisis febriles (el primero de ellos al año y medio de edad) y una crisis generalizada tónico-clónica afebril. En la actualidad sigue tratamiento con ácido valproico. La exploración neurológica fue normal. No se dispone de pruebas complementarias en esta paciente.

Los dos siguientes fenotipos más frecuentemente observados en esta familia fueron las crisis febriles y las crisis febriles plus con ausencias.

Crisis febriles

Fue identificado en 3 pacientes (**III-10**, **III-26** y **III-38**). Sus historias clínicas se describen a continuación.

Individuo III-10

Se trata de un sobrino del probando, fallecido en el momento del estudio. Nacido de un embarazo y parto sin complicaciones. Tuvo entre 4 y 5 crisis febriles típicas. Falleció de muerte súbita durante el sueño a los dos años y medio de edad.

Individuo III-26

Pacientte de 28 años en el momento del estudio, sobrina del probando. Presentó 2 episodios de pérdida de conocimiento en contexto febril a los 5 y 6 años de edad. El desarrollo psicomotor fue normal. No ha tenido crisis generalizadas tónico-clónicas ni episodios sugerentes de ausencias o mioclonias en la edad adulta. No se disponen de estudios complementarios en esta paciente.

Individuo III-38

Paciente de 22 años, sobrina del probando. Tuvo varias crisis febriles; la primera al año de edad y la última a los 3 años. No ha presentado crisis generalizadas tónico-clónicas ni ausencias ni mioclonias en la edad adulta. No se pudo explorar a esta paciente ni se dispone de pruebas complementarias.

Crisis febriles plus con ausencias

Este fenotipo fue observado en 3 individuos (**II-5**, **III-11** y **III-15**) cuyas historias clínicas son las siguientes:

Individuo II-5

Se trata de la hermana del probando, tiene 59 años en el momento del estudio. Presentó sufrimiento fetal agudo durante el parto que evolucionó favorablemente sin dejar secuelas. Tuvo varias crisis febriles, la primera a los 9 meses de edad y la última en la edad adulta. Poco después de las crisis febriles comenzó a presentar crisis generalizadas tónico-clónicas sin fiebre con una frecuencia elevada (hasta 1 crisis a la semana). Recibió tratamiento con Fenobarbital, difenilhidantoina y carbamacepina. A los 14 años, coincidiendo con biterapia de fenobarbital y difenilhidantoina, comenzó con crisis de ausencia típicas esporádicas. Las crisis epilépticas en esta paciente remitieron con el tratamiento con ácido valproico y en la actualidad lleva más de 15 años sin crisis. Esta paciente presentó además un episodio depresivo mayor y un intento autolítico. El examen neurológico fue normal. Se realizó un electroencefalograma que no mostró alteraciones significativas. No se dispone de prueba de imagen cerebral.

Individuo III-11

Paciente de 29 años, sobrina del probando. Comenzó con crisis generalizadas tónico-clónicas febriles y afebriles antes del año de edad. En ocasiones las crisis generalizadas se precedían de clonías en extremidades izquierdas. A los 4 años de edad se añaden episodios de “parada” y mirada fija de

segundos de duración, clínicamente compatibles con ausencias. Al inicio las crisis se desencadenaban con somidos y luces. A los 12 años sufre un ahogamiento en piscina en probable relación con una crisis. Es reanimada tras una parada cardiorrespiratoria prolongada, quedando con secuelas cognitivas leves (enlentecimiento en la velocidad de procesamiento de la información y disnomia). A partir de entonces las crisis parecen cambiar en sus características. Aparecen crisis parciales complejas y episodios paroxísticos no epilépticos (documentados en videoelectroencefalograma). Ha seguido tratamiento con múltiples fármacos (fenobarbital, primidona, ácido valproico, carbamacepina, lamotrigina, clobazam, topiramato y Levetiracetam) con control incompleto de la epilepsia. Ha tenido dos estatus tónico-clónicos generalizados en relación con cambios de medicación. Coincidiendo con uno de ellos presentó un episodio delirante. En la actualidad persisten crisis tónico-clónicas generalizadas nocturnas con una frecuencia de 1-3/mes. Son desencadenantes la ovulación-menstruación, el estrés y la privación de sueño. Además esta paciente presentó un trastorno depresivo desde la infancia. La exploración neurológica evidenció un retraso psicomotor leve. Los electroencefalogramas interictales mostraron una actividad de fondo discretamente enlentecida. Se detectaron anomalías epileptiformes en forma de descargas generalizadas de punta-onda y polipunta-onda irregular junto con anomalías focales en forma de puntas bifrontales y puntas independientes en ambas regiones temporales. La RM cerebral de 3T no mostró alteraciones y un PET fue normal. En la actualidad la epilepsia se comporta como una epilepsia refractaria en la que pensamos que existe un componente mixto; de un lado una epilepsia generalizada en relación con la susceptibilidad genética familiar y de otro lado una epilepsia focal sintomática a la hipoxia cerebral secundaria al ahogamiento.

Individuo III-15

Paciente de 23 años, sobrina del probando. Tuvo entre 2 y 3 crisis febriles a los 6 años de edad. A los 16 años aparecen crisis tónico-clónicas generalizadas afebriles y ausencias. La paciente fue tratada con carbamacepina que produjo un empeoramiento de su epilepsia. En la actualidad sigue tratamiento con ácido valproico a pesar del cual persisten crisis (tanto ausencias como crisis generalizadas tónico-clónicas) esporádicas. Esta paciente presentó un episodio depresivo en la adolescencia. La exploración neurológica fue normal. Los electroencefalogramas interictales fueron normales a excepción de uno realizado horas después de una crisis en el que se detectaron anomalías epileptiformes en forma de descargas de punta-onda en la región temporo-occipital derecha. El TC craneal no mostró anomalías.

Crisis febriles con mioclonias

Un individuo (**III-17**) presentó crisis febriles en la infancia, seguidas de CGTC y mioclonias en la adolescencia. El fenotipo fue compatible con **CF plus con mioclonias**.

Individuo III-17

Se trata de un sobrino del probando que tiene 20 años en el momento de este estudio. Presentó una crisis febril típica aislada a los 2 años de edad. A los 15 años aparecen crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles en relación con la falta de sueño, el cansancio físico y tareas de concentración. Se añaden mioclonias generalizadas de predominio en extremidades superiores, que aparecen de forma

esporádica, aisladas y sin relación con el despertar. El tratamiento con carbamacepina indujo un empeoramiento de las crisis. Actualmente sigue tratamiento con ácido valproico con un cumplimiento irregular y un control incompleto de la epilepsia. Persisten crisis generalizadas tónico-clónicas con una frecuencia media de 1 cada 6 meses. El examen neurológico fue normal. El electroencefalograma interictal no mostró anomalías epileptiformes. El TC craneal fue normal. La RM cerebral mostró un angioma venoso en lóbulo frontal derecho sin repercusión clínica.

Epilepsia generalizada con CGTC solo

Dos individuos (**II-13** y **III-27**) presentaron CGTC de inicio en la infancia sin crisis febriles asociadas y fueron clasificados como epilepsia generalizada con CGTC solo. Las historias clínicas se describen a continuación.

Individuo II-13

Se trata del **probando** que tiene en el momento del estudio 50 años. La epilepsia comenzó a los 2 años de edad con crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles frecuentes (entre 1 y 8 episodios al mes). Recibió tratamiento con varios fármacos antiepilépticos (fenobarbital, difenilhidantoína, carbamacepina) con un seguimiento clínico irregular y una respuesta incompleta al tratamiento. Las crisis mejoraron con la edad hasta que a los 17 años el paciente decidió suspender voluntariamente la medicación. Desde entonces ha presentado crisis generalizadas tónico-clónicas esporádicas, la última hace 3 años. Nunca tuvo crisis febriles, ni episodios compatibles con ausencias o mioclonias. La exploración neurológica fue normal. El EEG interictal mostró anomalías epileptiformes en forma de descargas generalizadas de punta-onda y polipunta-onda irregular a 3-3,5 Hz sobre una actividad de fondo normal. No se dispone de prueba de imagen cerebral.

Individuo III-27

Paciente de 24 años, sobrino de la probando. Ha presentado hasta el momento un total de 5 crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles; la primera a los 5 años de edad y la última a los 19 años de edad. La ingesta de 2 litros de coca-cola precedió a uno de los episodios ocurrido en la adolescencia. No tuvo crisis febriles ni episodios sugerentes de ausencias o mioclonias. La exploración neurológica fue normal. Las pruebas complementarias (electroencefalograma interictal y TC craneal) no mostraron alteraciones. En la actualidad sigue tratamiento con ácido valproico y lleva 5 años sin crisis.

Epilepsia generalizada con CGTC y ausencias

Este fenotipo fue observado en una paciente (**II-7**) que comenzó con CGTC en la infancia seguidas de ausencias.

Individuo II-7

Se trata de la hermana del probando, de 56 años en el momento de este estudio. La epilepsia comenzó a los 8 años de edad con crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles frecuentes (hasta 1 episodio a la semana) y crisis muy breves consistentes en detención de la actividad, mirada fija y automatismos orales que fueron interpretadas de ausencias. Recibió tratamiento con difenilhidantoína, ácido valproico y lamotrigina. La evolución fue hacia la mejoría y desaparición de las crisis. La

exploración neurológica fue normal. El electroencefalograma interictal mostró anomalías epileptiformes en forma de descargas de punta-onda y polipunta-onda generalizada irregular a 3-3,5 Hz. El TC craneal fue normal. Esta paciente falleció durante la realización del estudio, fue encontrada en casa sin que se conozcan más datos. No se realizó estudio de autopsia.

Epilepsia del lóbulo temporal

Una paciente (**III-18**) presentó un fenotipo fue compatible con una epilepsia del lóbulo temporal sin crisis febriles.

Individuo III-18

Paciente de 39 años, sobrina del probando, nacida de un parto prolongado complicado con sufrimiento fetal agudo. No tuvo crisis febriles. El desarrollo psicomotor fue normal. La epilepsia comenzó a los 3 años de edad. Ha presentado dos tipos de crisis:

- crisis parciales simples con sintomatología autonómica y psíquica consistente en malestar epigástrico ascendente, déjà-vu y sensación de pánico de segundos de duración.
- crisis parciales complejas con generalización tónico-clónica secundaria que pueden iniciarse o no con la sensación de déjà-vu, seguida de desconexión del medio automatismos orales en forma de chupeteo, giro forzado de la cabeza (generalmente hacia la izquierda) y convulsiones generalizadas. El último episodio de estas características ocurrió hace 9 años.

En la actualidad esta paciente sigue tratamiento con ácido valproico con un control aceptable de su epilepsia. Persisten crisis parciales simples con una frecuencia de 2 a 3 episodios/año. Los electroencefalogramas interictales mostraron anomalías epileptiformes en forma de descargas de punta-onda y polipunta en ambos lóbulos temporales de predominio derecho. Se realizó un TC craneal que fue normal. Se desconoce la existencia de esclerosis mesial ya que no se realizó RM cerebral.

Epilepsias no clasificables

En cinco individuos (**I-2, II-17, III-3, III-30, IV-5**) el fenotipo de la epilepsia fue considerado como no clasificable debido a que la información clínica disponible no fue suficiente.

Individuo I-2

Se trata de la madre del probando. Presentó alrededor de 3 crisis generalizadas tónico-clónicas entre los 12 y los 14 años de edad. Se desconoce si presentó o no crisis febriles en la infancia. No se hizo ningún estudio de la epilepsia, no recibió tratamiento ni se realizó ningún seguimiento clínico, probablemente por dificultad para acceder a una atención médica especializada en el momento en que sucedieron las crisis. La paciente falleció a los 84 años a causa de una cardiopatía de la que se desconocen más datos.

Individuo II-17

Hermano menor del probando. Presentó crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles esporádicas de inicio en la adolescencia. No se conocen más datos de la historia de la epilepsia ni se dispone de pruebas complementarias ya que el paciente no hizo ningún seguimiento clínico. Este

paciente falleció de muerte súbita a los 38 de edad. La causa hipotética de la muerte fue un infarto agudo de miocardio según la información transmitida a la familia, aunque no se conocían antecedentes de cardiopatía en este paciente y el estudio de autopsia no determinó la causa del fallecimiento.

Individuo III-3

Paciente de 28 años, sobrina del probando, diagnosticada de retraso mental grave secundario a hipotiroidismo congénito a los 2 años de edad. A los 10 años comenzó con crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles y crisis pluricotidianas de desconexión del medio con componente atónico asociado (se le caían objetos de las manos), que fueron diagnosticadas de ausencias. No tuvo crisis febriles ni mioclonias. Ha ensayado tratamiento con ácido valproico, lamotrigina, clonazepam y topiramato. En la actualidad las crisis generalizadas tónico-clónicas han desaparecido mientras que persisten crisis de ausencia. El electroencefalograma fue normal. No disponemos de prueba de imagen cerebral. El análisis de secuenciación no mostró la mutación en *SCN1A* encontrada en el resto de afectos, lo que confirma que se trata de una fenocopia.

Individuo III-30

Paciente de 26 años, sobrina del probando, con antecedentes personales de asfixia perinatal en el contexto de una crisis sufrida por la madre durante el parto y un retraso psicomotor residual de grado moderado. Presentó varias crisis febriles; la primera a los 2 años de edad y la última difícil de precisar. A los 3 años aparecen crisis generalizadas tónico-clónicas sin fiebre y más tarde episodios consistentes en sacudidas repetidas de un hemicuerpo. Estos últimos episodios fueron estudiados mediante video-EEG e informados como pseudocrisis. En la actualidad sigue tratamiento con tres fármacos (topiramato, ácido valproico y carbamacepina) con un control incompleto de la epilepsia. No se pudo explorar a esta paciente ni se dispone de los estudios complementarios realizados. Es posible que se trate de una epilepsia mixta en la que intervenga por un lado el componente genético y por otro lado las secuelas de una anoxia perinatal y a la que se añaden pseudocrisis.

Individuo IV-5

Varón de 12 años, hijo de la paciente III-18 la cual presentó varias convulsiones durante el embarazo que fueron tratadas con diazepam. El paciente presentó complicaciones respiratorias al nacimiento. El desarrollo psicomotor posterior fue normal. No presentó crisis febriles. A los 2 años de edad debutó con un estado epiléptico convulsivo afebril de 1 hora de duración. Durante el ingreso fue estudiado con un TC craneal y un electroencefalograma que fueron normales. Entre los 2 y los 6 años presentó episodios consistentes en desconexión del medio, arreactividad y pérdida del tono muscular con caída al suelo. Estos episodios fueron catalogados de ausencias atónicas. Actualmente sigue tratamiento con ácido valproico y lleva 6 años sin crisis. La exploración neurológica fue normal.

De esta familia interesa destacar también:

- El individuo **III-9**, que falleció de muerte súbita durante el sueño a los 2 años de edad, tal como su hermano (III-10). El día anterior a su fallecimiento tuvo fiebre. No se conocían antecedentes de crisis hasta ese momento en este paciente.

- El individuo **III-20** (portador asintomático de la mutación) presentó un episodio aislado de pérdida conocimiento durante el servicio militar que fue estudiado mediante un electroencefalograma que resultó normal. No han vuelto a repetirse posteriormente ni se ha establecido por lo tanto el diagnóstico de epilepsia en este paciente.

Figura 10. Familia EIG-24

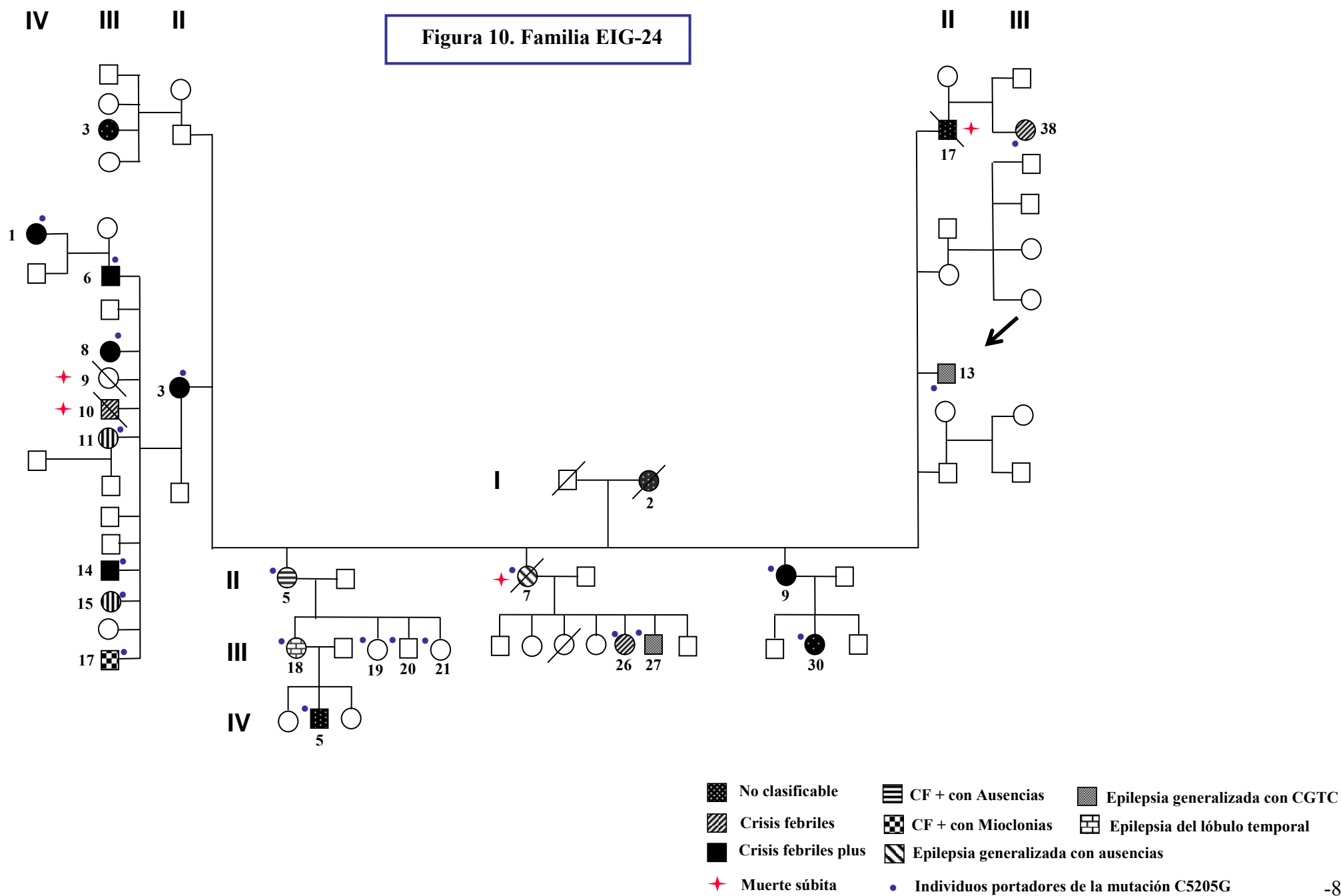


Tabla 8 . Familia EIG-24. Características clínicas de los pacientes

Individuo	Sexo/Edad	Crisis febriles Ed 1ª/última	Crisis afebriles Nº	Ed io/f	Tipo	Examen neurológico	EEG	RM/TC	Fenotipo	Tratamientos recibidos	Evolución
II-13	V/50	No	>10	2a/-	CGTC	N	PO/PPO gen	-	EGCGTC	AVP,FB,DFH	Persisten crisis
I-2	M/X	?	<5	12/14a	CGTC	N	-	-	No clasificable	-	Remisión
II-3	M/61	6a/7a	-	-	-	N	N	-	CF+	-	Remisión
II-5	M/59	9m/?	>10	9m/42a	CGTC,Au	N	N	-	CF+ y Au	AVP,FB,DFH,CBZ	Remisión
II-7	M/56	No	>10	8a/-	CGTC,Au	N	PO/PPO gen	N	EGA	AVP, DFH,LTG	Muerte súbita
II-9	M/53	8a/?	5-10	8a/-	CGTC	N	PO gen	N	CF+	AVP,FB, DFH,TPM.	Refractaria
II-17	V/X	?	?	?	CGTC	N	-	-	No clasificable	?	Muerte súbita
III-3	M/28	No		10a/-	CGTC,Au	R	N	-	No clasificable	AVP,LTG,CLN,TPM	Persiste
III-6	V/36	3a/?	5-10	3a/-	CGTC	N	N	N	CF+	-	Persiste
III-8	M/33	3a/6a	< 5	31a/31a	CGTC	N	N	N∅	CF+	CBZ	Persiste
III-10	V/X	2a/?	-	-	-	-	-	-	CF	-	Muerte súbita
III-11	M/29	<1a/?	>10	<1a/-	CGTC,Au	R	PO/PPO gen/POTD	N	CF+ y Au	AVP,CBZ,LTG	Refractaria
III-14	V/24	¿/<6a	< 5	?/16a	CGTC	N	N	N	CF+	-	Remisión
III-15	M/23	6a/6a	5-10	16a/-	CGTC,Au	N	POTD	N	CF+ y Au	AVP	Persiste
III-17	V/20	2a/2a	< 5	15a/-	CGTC,Mio	N	N	N	CF+ y Mio	AVP	Persiste
III-18	M/39	No	>10	3a/-	CPC2ª/G, CPS	N	PO/PPT bilat	N	ELT	AVP	Persisten crisis
III-26	M/28	5/6a	< 5	No	-	N	-	-	CF	-	Remisión
III-27	V/24	No	5	5a/18a	CGTC	N	N	N	EGCGTC	AVP	Remisión
III-30	M/26	2a/?	5-10	3a/-	CGTC,SC	R	-	-	No clasificable	AVP,CBZ,TPM	Refractaria
III-38	M/22	1a/3a	< 5	No	-	N	-	-	CF	-	Remisión
IV-1	M/4	1a/-	< 5	3a/-	CGTC	N	-	-	CF+	AVP	Persisten crisis
IV-5	V/12	No	>10	2a/6a	CGTC,Au	N	-	N	No clasificable	AVP	Remisión

Au: ausencias, **AVP:** ácido valproico, **CBZ:** Carbamazepina **CF+:** crisis febriles plus, **CF+ y Au:** crisis febriles plus y ausencias, **CF+ y Mio:** crisis febriles plus y crisis mioclónicas, **CLN:** clonazepam, **CGTC:** Crisis generalizadas tónico-clónicas, **CLN:** clonazepam, **CPC2ª/G:** Crisis parciales complejas secundariamente generalizadas, **DFH:** difenilhidantoína, **E1ª/última:** Edad de la 1ª y de la última crisis febril, **Eio/f:** Edad de la primera y última crisis afebril, **EEG:** electroencefalograma, **EGA:** epilepsia generalizada con ausencias, **EGTC:** epilepsia generalizada con crisis generalizadas tónico-clónicas solo, **ELT:** epilepsia del lóbulo temporal, **FB:** fenobarbital, **LTG:** lamotrigina, **M:** mujer, **N:** normal, **PO:** punta-onda, **PPO:** polipunta onda, **POTD:** punta-onda temporal derecha, **R:** retraso psicomotor, **RM/TC:** resonancia magnética/tomografía computarizada, **SC:**seudocrisis, **TPM:** topiramato, **V:** varón

4.2.1.3 Estudio cardiológico

Cuatro individuos de la familia (*II-7*, *II-17*, *III-9* y *III-10*), tres de ellos con epilepsia conocida, fallecieron de muerte súbita. El individuo *II-17* murió estando solo en casa, sin testigos, a los 38 años de edad. No se encontraron signos de crisis epilépticas recientes ni se conocía enfermedad alguna al margen de la epilepsia. Se sospechó un infarto agudo de miocardio que no se confirmó en el estudio de autopsia. La paciente *II-7* también falleció estando sola en casa, no se conocen las causas ni se hizo estudio de autopsia. Los otros dos pacientes (*III-9* y *III-10*), hermanos, fallecieron a los dos años de edad durante el sueño, sin que se detectase causa alguna del fallecimiento. No se realizó estudio de autopsia.

Dada la coincidencia de epilepsia y muerte súbita en esta familia se llevó a cabo un estudio cardiológico completo con la finalidad de buscar posibles anomalías cardíacas subyacentes. Este estudio fue realizado en cuatro individuos afectados de epilepsia (*II-3*, *III-11*, *III-14* y *III-17*) y tres controles sanos (*III-7*, *III-12* y *III-16*) del mismo núcleo familiar. El estudio cardiológico incluyó una historia clínica cardiológica detallada, un electrocardiograma de 12 derivaciones, un holter de 12 derivaciones, un ecocardiograma transtorácico, una ergometría, un test de flecainida y un test de isoproterenol (para conocer los detalles y condiciones de realización de estas pruebas ver apartado de material y métodos). La evaluación cardiológica fue realizada en la Unidad de Arritmias del Hospital Clínico San Carlos de Madrid bajo la supervisión de los Dres Pérez Castellano y Pérez Villacastín.

No se detectaron anomalías estructurales ni alteraciones del ritmo cardíaco responsables de muerte súbita en ninguno de los pacientes estudiados. Los resultados del estudio cardiológico se resumen en la **tabla 9**.

Tabla 9. Resultados del estudio cardiológico

<i>Indiv</i>	<i>ECG</i>	<i>Ecocardiograma</i>	<i>Holter</i>	<i>Ergometría</i>	<i>T Flecainida</i>	<i>T Isoprenalina</i>
<u><i>II-3</i></u>	RS,QTc 392ms	IM e IT leves	RS, 51EA, 31EV	Negativa, 12 METS	Negativo	QTcmáximo 436ms
<i>III-7</i>	RS,QTc 373 ms	Normal	RS,1EV	Negativa, 15 METS	No realizado	No realizado
<u><i>III-11</i></u>	RS,QTc 386 ms	IT leve	RS	Negativa, 15 METS	Negativo	QTc máximo 481 ms
<i>III-12</i>	RS,QTc 364 ms	Normal	RS	Negativa, 17 METS	Negativo	QTc máximo 406 ms
<u><i>III-14</i></u>	RS,QTc 371 ms, DCIV	Normal	RS,13EA	Negativa, 19 METS	Negativo	QTc máximo 456 ms
<i>III-16</i>	RS,QTc 394 ms	Normal	RS, 1EA, 2EV	Negativa, 18 METS	Negativo	QTc máximo 451 ms
<u><i>III-17</i></u>	RS,QTc 412 ms	Normal	RS, 20 EA	Negativa, 21 METS	No realizado	No realizado

DCIV: Defecto inespecífico de la conducción intraventricular, EA: Extrasístole auricular, EV: Extrasístole ventricular, IM: Insuficiencia mitral, IT: Insuficiencia tricúspide, METS: medida del gasto energético durante la prueba, QTc: Intervalo QT corregido (valores normales de referencia: 300-450 ms), RS: Ritmo sinusal. Los individuos que aparecen subrayados son los afectados de epilepsia.

4.2.1.4 Pruebas complementarias

Se realizó electroencefalograma en 14 pacientes. El estudio fue normal en 8 (II-3,II-5,III-3,III-6,III-8,III-14,III-17,III-27), mostró anomalías epileptiformes generalizadas en forma de punta-onda y polipunta-onda irregular en 4 individuos (II-7, II-9, II-13, III-11) y anomalías focales de expresión temporal y/o temporo-occipital en 3 individuos (III-11,III-15 y III-18). El individuo III-11 mostró simultáneamente anomalías focales temporales y generalizadas. Once pacientes (II-7,II-9,III-6,III-8,III-11,III-14,III-15,III-17,III-18,III-27,IV-5) fueron estudiados con pruebas de imagen cerebral (TC y/o RM cerebral). Los estudios de neuroimagen fueron normales en todos ellos.

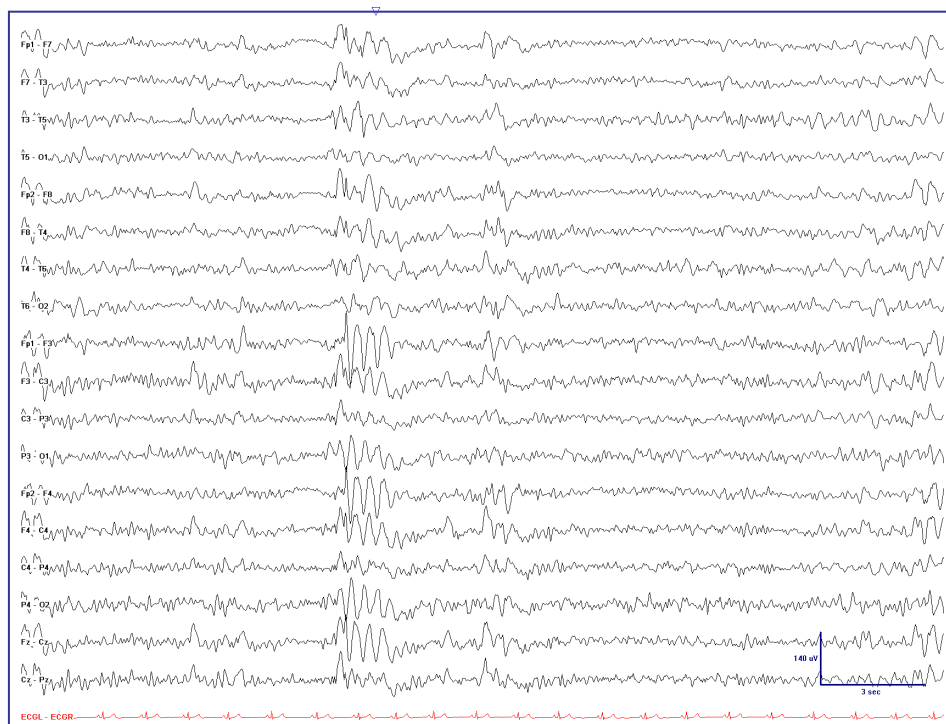


Figura 11a. Individuo III-11. Descarga generalizada de punta-onda irregular

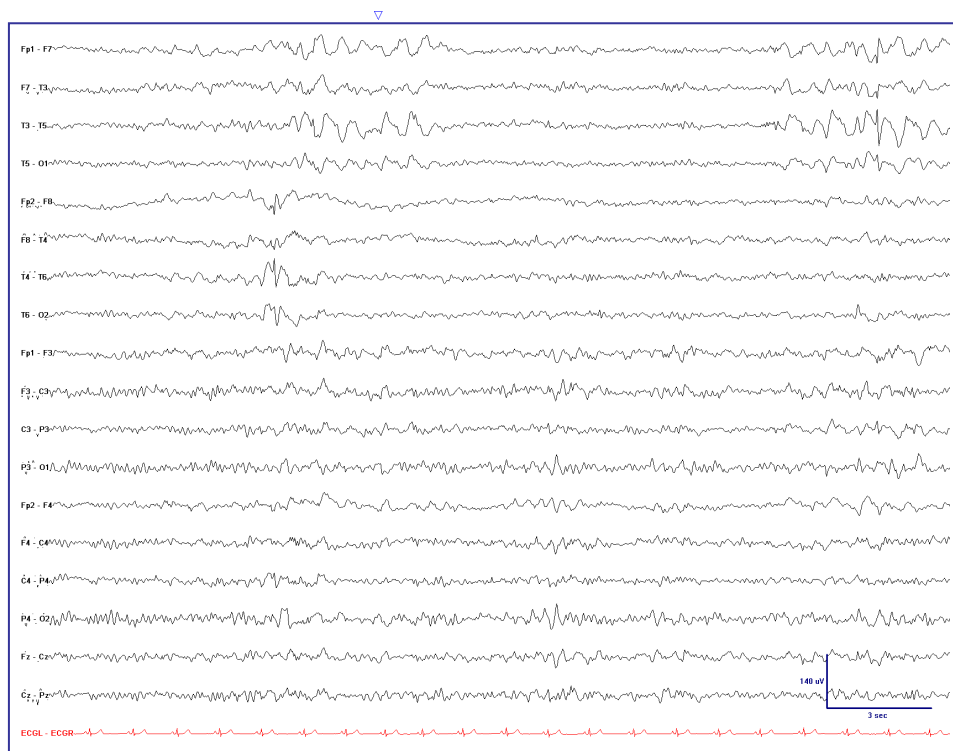


Figura 11 b. Individuo III-11. EEG interictal. Puntas focales independientes sobre ambas regiones temporales. 10 sg/pg

Imágenes cedidas por cortesía del Dr. Antonio Gil Nagel, H. Ruber Internacional

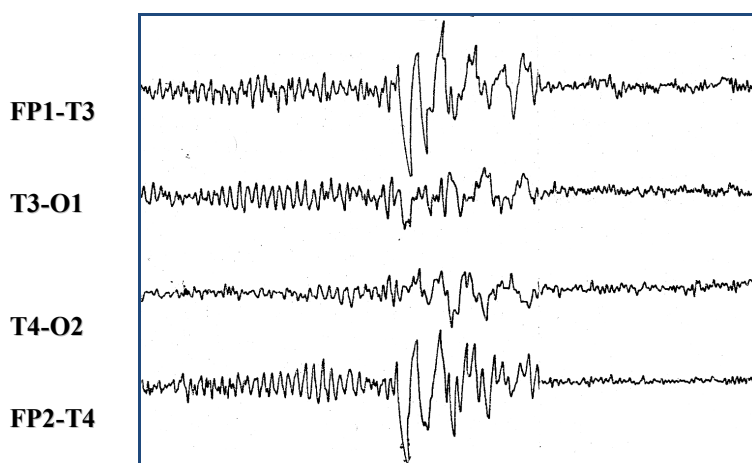


Figura 12. Individuo II-13 (probando). Descarga generalizada de punta-onda irregular

4.2.2 Análisis molecular

Se obtuvieron un total de 49 muestras de ADN entre individuos afectados y sanos de esta familia (EIG-24). El análisis de ligamiento a los loci descritos asociados a la epilepsia generalizada con crisis febriles plus reveló una puntuación lod-score de 5,14 ($\theta = 0,01$) para el marcador D2S1776 correspondiente a la región cromosómica 2q24 donde se localiza el gen de la subunidad alfa-1 del canal de sodio cerebral (*SCN1A*). La secuenciación directa de los 26 exones codificantes del gen en cuatro individuos afectados (*II-3*, *II-7*, *II-9* y *II-13*) mostró un cambio de nucleótido (guanina por citosina) en heterocigosis en la posición 5205 del gen (**C5205G**). Esta variación resulta en el cambio de un aminoácido de arginina por lisina en la posición 1735 de la proteína (**N1735K**). No se detectó esta variación en 234 controles [tesis doctoral “*Genética Molecular de las Epilepsias Idiopáticas Generalizadas*”, Dra. L Sáez].

La presencia del cambio fue analizada en el resto de individuos mediante un análisis de SSCP. Todos los individuos afectados resultaron portadores heterocigotos de la mutación a excepción del individuo *III-3* que corresponde a una fenocopia. Además se identificó la mutación en tres individuos asintomáticos del mismo núcleo familiar (*III-19*, *III-20* y *III-21*).

El cambio de aminoácido se localiza a nivel del bucle extracelular situado entre el segmento S5 y S6 del cuarto dominio (DIV) de la proteína. Esta región está implicada en la interacción entre la subunidad $\alpha 1$ y la subunidad $\beta 1$ del canal de sodio [Makita *N y col*, 1996] [Qu *y col*, 1999]. El cambio de aminoácido da lugar a la sustitución de una carga neutra por una carga positiva, lo que podría alterar la interacción iónica entre ambas subunidades y la función del canal.

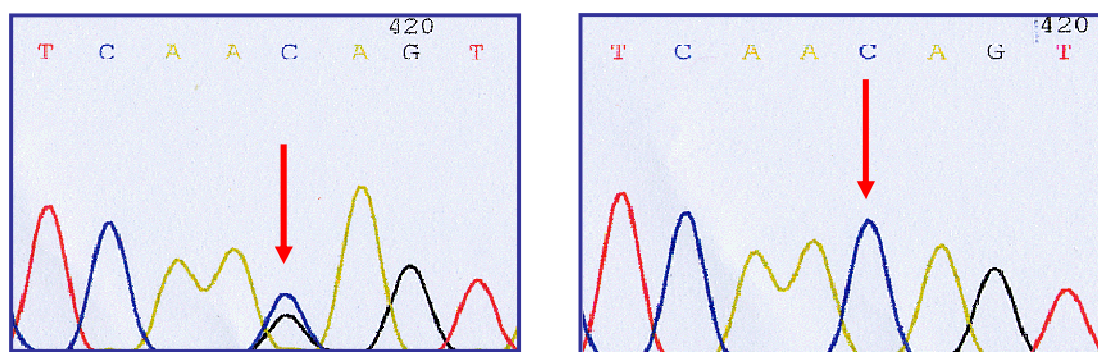


Fig 13. Análisis de secuenciación: a. paciente y b. individuo control

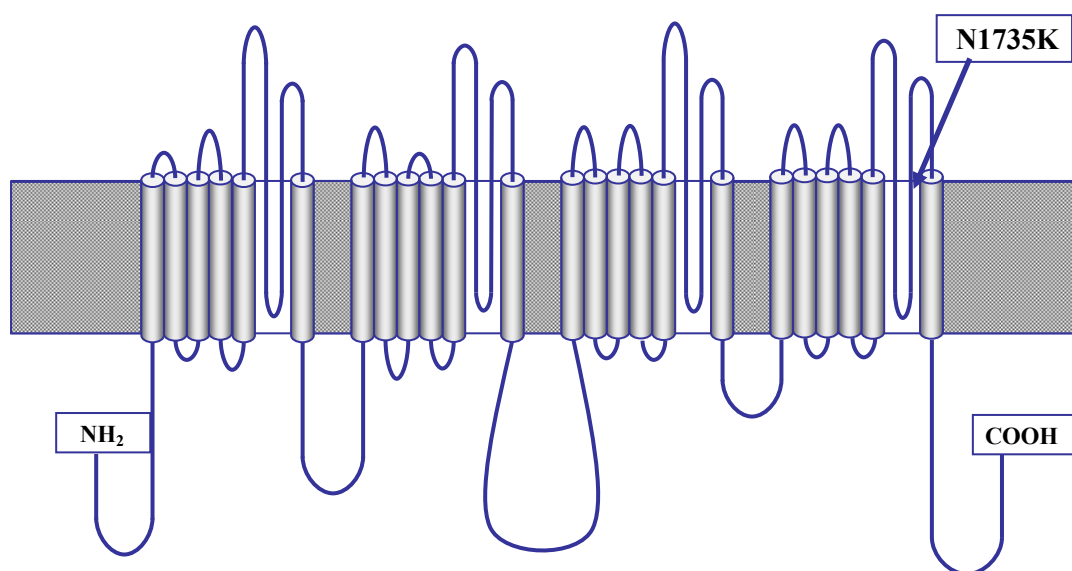


Fig 14 . Esquema de la estructura proteica de la subunidad alfa del canal de sodio cerebral y localización de la mutación N1735K

4.2.3 Estudio electrofisiológico

Para conocer las consecuencias funcionales de la mutación N1735K el equipo del Dr. H Lerche introdujo la mutación en la subunidad $\alpha 1$ del canal de sodio neuronal humano y expresó la subunidad mutada junto a subunidades auxiliares $\beta 1$ y $\beta 2$ en células de mamífero (tsA201). Las características electrofisiológicas fueron estudiadas mediante la técnica de “patch clamp” de célula completa. El análisis estadístico fue realizado mediante el test de T’Student.

El análisis electrofisiológico del canal mutado mostró (**Figura 15**):

- Una reducción aproximada del 50 % de la densidad de corriente de sodio comparado con la forma nativa del canal
- Un enlentecimiento significativo ($p < 0.001$) en la recuperación del estado de inactivación rápida del canal. No se evidenciaron cambios en el voltaje de activación e inactivación del canal ni en la duración de la inactivación rápida del canal.

Ambos mecanismos conducen a una pérdida de la función del canal. La coexpresión de las subunidades auxiliares $\beta 1$ y $\beta 2$ no fue suficiente para corregir el defecto funcional producido por la mutación. Las consecuencias funcionales de la mutación N1735K son similares a las descritas en otras familias con GEFS +.

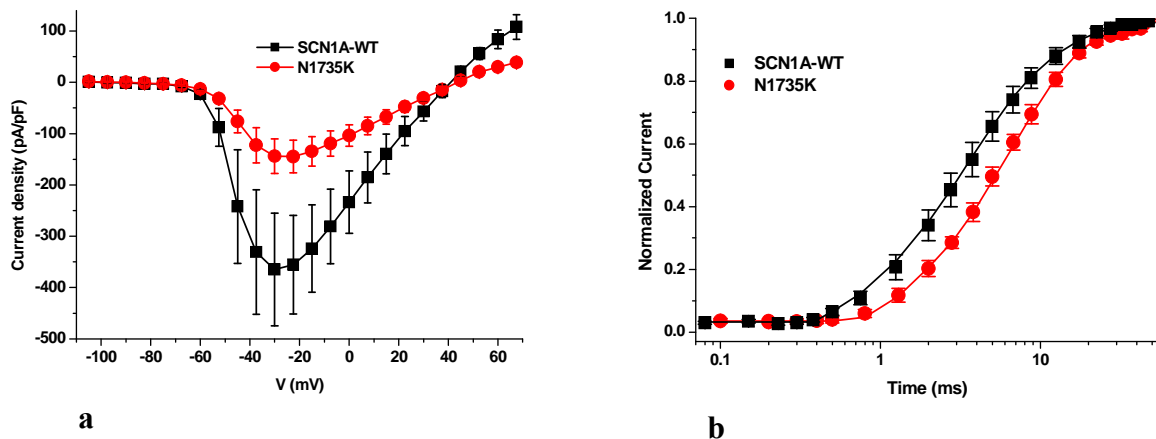


Fig 15. Resultados del estudio electrofisiológico

- Curva de activación del canal mostrando la reducción de la densidad de corriente del canal mutado comparado con la forma nativa del canal (SCN1A-WT)
- Curva de cinética de apertura del canal, mostrando el desplazamiento de la curva a la derecha provocado por el enlentecimiento en la recuperación del estado de inactivación del canal mutado con respecto al nativo ($p < 0.001$).

4.3 FAMILIA ED-HNP

4.3.1 Análisis clínico

4.3.1.1 Características del árbol genealógico

Se trata de una familia de origen gallego en la que se identificaron tres mujeres afectas de heterotopia nodular periventricular (HNP) y síndrome de Ehler-Danlos (ED) en tres generaciones sucesivas (**Figura 16**). El análisis del árbol mostró que ambas enfermedades se segregaban conjuntamente. Las mujeres fueron las afectas y portadoras de ambos trastornos mientras que los hombres eran sanos y constituían un número reducido dentro de la familia. Estas características son compatibles con una herencia dominante ligada al cromosoma X que afecta a mujeres y puede resultar letal en los varones.

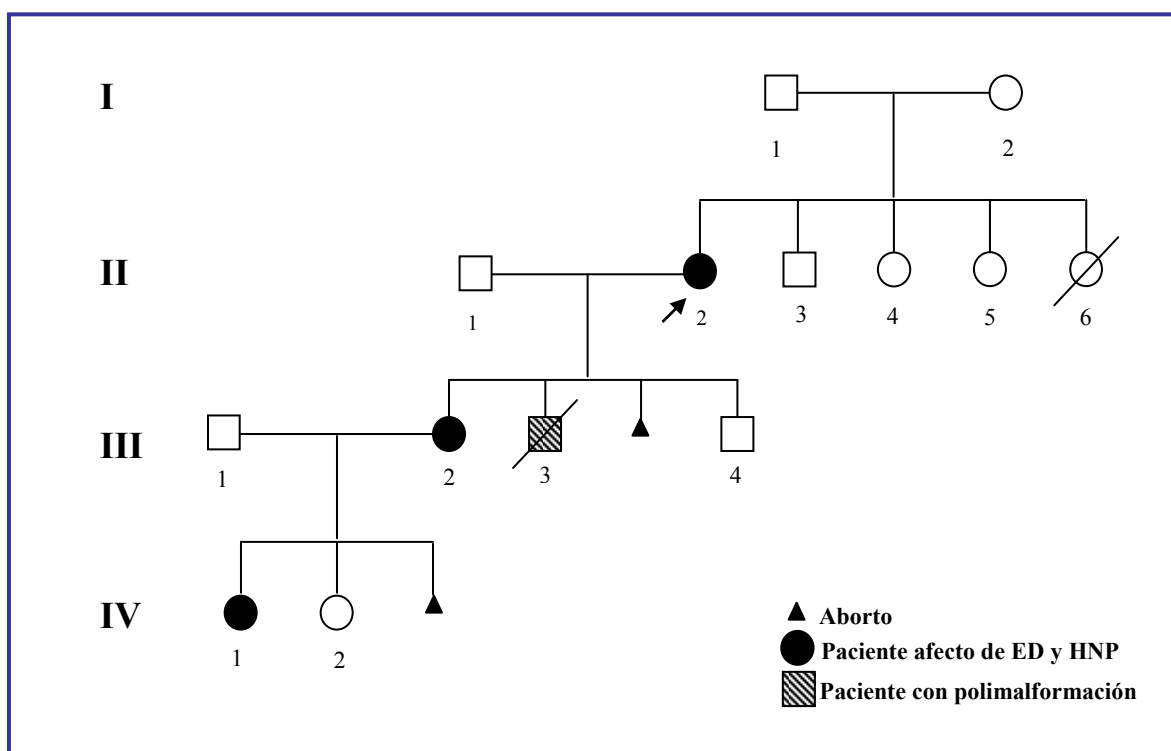


Figura 16. Árbol genealógico de la familia ED-HNP

4.3.1.2 Características clínicas y fenotipo de los pacientes

Individuo II-2

La probando de esta familia es una mujer de 68 años con antecedentes de luxaciones recurrentes de ambos codos espontáneas o en relación con mínimos esfuerzos desde la infancia. A los 20 años de edad comenzó a presentar crisis parciales complejas (caracterizadas por una sensación epigástrica ascendente seguida de pérdida del habla y desconexión del medio) y crisis secundariamente generalizadas. Fue diagnosticada de epilepsia del lóbulo temporal. A los 40 años se añaden luxaciones en ambas articulaciones escapulo-humerales con una frecuencia de 1-2 episodios al año. Es diagnosticada de una hernia de hiato. A los 65 años de edad presentó una hemorragia subaracnoidea. La angiorresonancia y la arteriografía cerebral fueron normales. No se detectaron aneurismas ni malformaciones vasculares causantes de la hemorragia.

El examen físico mostró una hiperlaxitud articular (**figura 17 a**) y una piel suave, hiperextensible, sin cicatrices atróficas. La exploración neurológica fue normal.

La resonancia magnética cerebral mostró una heterotopia nodular periventricular bilateral asociada a una megacisterna magna (**figura 18 a**). El electroencefalograma interictal mostró brotes de actividad lenta bitemporal. Un ecocardiograma transtorácico mostró un prolapso de la válvula mitral con una insuficiencia mitral leve. La analítica mostró cifras elevadas de anticuerpos antifosfolípido (IgG: 14,5Ua e IgM: 19,5Ua siendo los valores de referencia normales del laboratorio: 0-10Ua y 0-7Ua respectivamente). El estudio al microscopio electrónico de la biopsia de piel mostró fibras de colágeno anómalas con diámetros y morfologías irregulares (**figura 19 a**). No se observaron anomalías en las fibras de elastina.

La probando tuvo cuatro hermanos: una hermana que falleció a los 29 años de edad a causa de un infarto agudo de miocardio del que se desconocen más datos y tres hermanos (incluyendo un varón y dos hembras) sanos.

Esta paciente presentó cuatro embarazos. El primer embarazo dio lugar a una hija afecta (individuo III-2) que se describe a continuación. El segundo embarazo dio lugar a un recién nacido vivo varón (III-3) con numerosas malformaciones incluyendo labio leporino, paladar hendido, anomalías cardíacas y genitales y que falleció a las pocas horas de vida. El tercer embarazo resultó en un aborto espontáneo al cuarto mes de gestación. El sexo de este aborto se desconoce. Por último tuvo un hijo sano (individuo III-4) al que se realizó una RM cerebral que fue normal.

Individuo III-2

La hija de la probando es una mujer de 40 años que fue remitida a la consulta de neurología para valoración tras presentar un episodio de inestabilidad y pérdida de conocimiento cuyo origen no pudo ser bien filiado. Entre los antecedentes personales constaban dificultades de lecto-escritura en la infancia y cefaleas frecuentes de características mixtas (vasculares y tensionales). Se referían además luxaciones repetidas de ambas rodillas (preferentemente la derecha) y de ambos hombros desde los 14-15 años de edad. Estas luxaciones se desencadenaban con traumatismos menores y con una frecuencia aproximada de 2 veces al año. Hasta el momento del estudio, esta paciente no presentó crisis epilépticas.

En el examen clínico se observó una piel suave y elástica, una hiperlaxitud articular marcada (**figura 17 b y 17 c**) y anomalías esqueléticas incluyendo paladar ojival, tórax excavado, escoliosis e hiperlordosis lumbar. El examen neurológico fue normal.

Los estudios complementarios incluyendo un análisis completo de sangre, estudio cardiológico y electroencefalograma fueron normales. Las pruebas de imagen cerebral (TC y RM) mostraron una heterotopia nodular periventricular bilateral (**figura 18 b y 18 d**), una megacisterna magna y una imagen localizada en la región parietal derecha compatible con un angioma venoso.

Esta paciente tuvo un aborto del que no se conocen más datos, una hija sana (individuo IV-2) y una afecta (individuo IV-1).

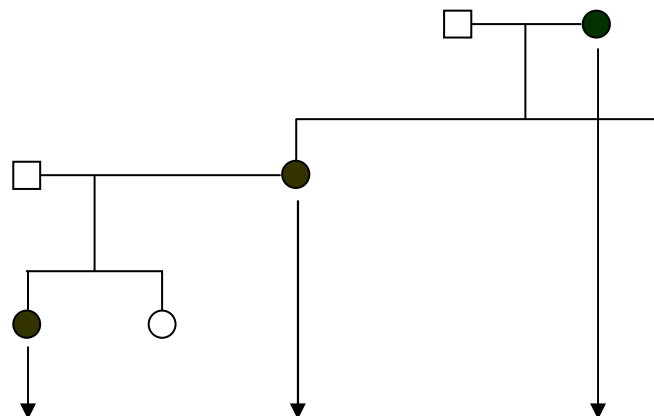
Individuo IV-1

La nieta de la probando es una mujer de 19 años con antecedentes de luxaciones patelares recurrentes espontáneas o en relación con traumatismos mínimos desde la infancia. Estas luxaciones llegaron a presentarse con una frecuencia semanal. La paciente había sido intervenida de estenosis pilórica y de hernias inguinales bilaterales durante el primer año de vida. A los 18 años comienza con episodios de desconexión y arreactividad seguidos de rigidez y convulsiones generalizadas compatibles con crisis parciales secundariamente generalizadas.

El examen físico mostró una piel fina, hiperextensible, sin cicatrices hipertróficas y una hiperlaxitud articular. Se observaron además una hiperlordosis lumbar, un paladar ojival y anomalías gingivales y dentarias. La exploración neurológica fue normal a excepción de un temblor postural leve.

El electroencefalograma basal resultó normal y la RM cerebral mostró una heterotopia nodular periventricular y una megacisterna magna (**figura 18 c**).

A continuación se muestran imágenes de la hiperelasticidad articular, pruebas de imagen cerebral y biopsia cutánea realizadas a las pacientes. Las características clínicas de cada una de ellas se resumen de forma esquemática en la **tabla 10**.



Individuo	IV-1	III-2	II-2
Hiperelasticidad cutánea	+	+	+
Hiperlaxitud articular	+	+	+
	Luxaciones rótula	Luxaciones hombros y rodillas	Luxaciones codos y hombros
Anomalías viscerales	Hernia inguinal bilateral - Estenosis piloro	-	Hernia hiato
Hemorragias internas	-	-	HSA
Alteraciones hematológicas	-	-	SAF
Anomalías cardiovasculares	-	-	Prolapso mitral
Anomalías esqueléticas	Paladar ojival Hiperlordosis lumbar Anomalías dentarias	Paladar ojival Escoliosis/hiperlordosis Torax excavado	-
Epilepsia	+	-	+
EEG	Normal	Normal	Lentificación temporal
RM cerebral	HNP Megacisterna magna	HNP Megacisterna magna	HNP Megacisterna magna

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes pertenecientes a la familia ED-HNP. HNP: Heterotopia nodular periventricular, HSA: Hemorragia subaracnoidea, SAF: Síndrome antifosfolípido, +: si, -: No.

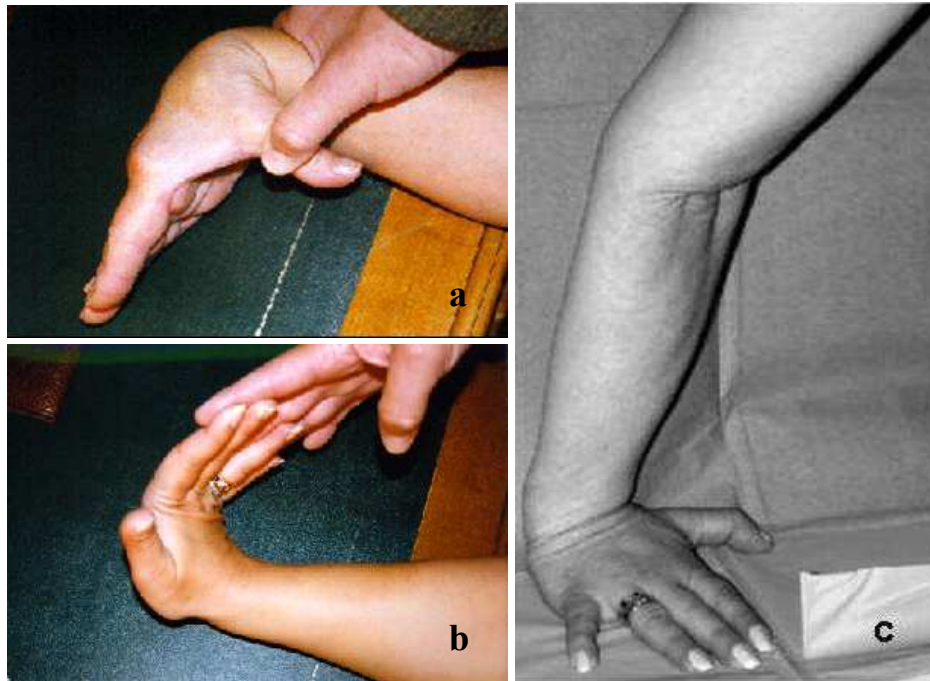


Figura 17. Hiperlaxitud articular en individuos II-2 (a) y III-2 (b y c)

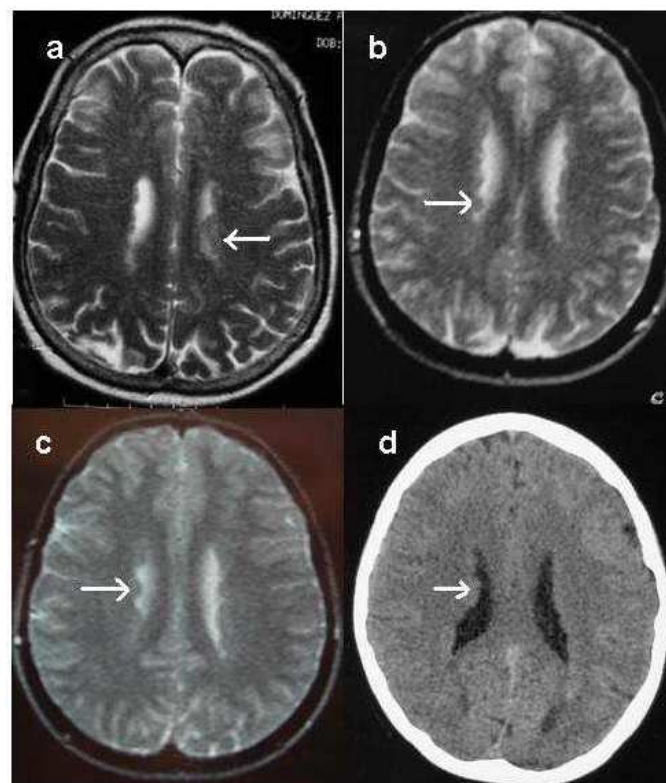
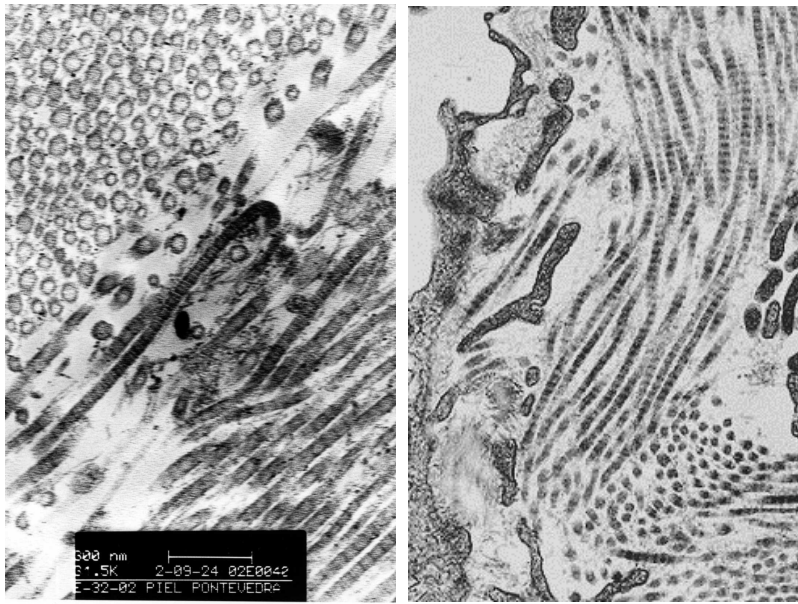


Figura 18. Resonancia magnética cerebral (RM) y tomografía computarizada (TC) mostrando la heterotopia nodular periventricular (HNP). Imágenes de RM en T2 correspondientes a los pacientes II-2 (a), III-2 (b) y IV-1 (c). TC sin contraste mostrando la HNP en el paciente III-2 (d). Las flechas señalan los nódulos característicos.



a. b.
Figura 19. Estudio ultraestructural de una biopsia de piel mostrando variaciones en el tamaño y alteraciones en la disposición de las fibras de colágeno en la probando (a) y en un individuo control (b). El material amorfo corresponde a fibras de elastina normales

4.3.2 Análisis genético

El modo de herencia en esta familia fue compatible con una herencia dominante ligada al cromosoma X tal y como se ha descrito en familias con HNP. El análisis mutacional del gen de la filamina A (*FLNA*) detectó una nueva mutación segregando con la combinación de ambos fenotipos (Ehler-Danlos y HNP). Esta mutación consiste en el cambio de citosina por timina en la posición 383(c.383C>T) del gen (exón 3) (**figura 20**) lo que da lugar al cambio de una alanina por valina (p.Ala128Val) situado en el dominio de unión a la actina (ABD) de la proteína. La mutación elimina un sitio de restricción del enzima *Hae* III. Para valorar ésto se amplificó el ADN genómico con cebadores específicos obteniéndose una secuencia de 115 pares de bases (pb) que fue digerida con el enzima *Hae* III y analizada en un gel de poliacrilamida. El análisis de RFLPs mostró cuatro fragmentos de 8, 27, 34 y 46 pb en los individuos normales mientras que los individuos portadores de la mutación mostraron un nuevo fragmento de 61 pb (27 + 34 pb) resultado de la pérdida del sitio de restricción (**figura 21**). Este cambio no fue observado en los individuos sanos de la familia ni en 184 cromosomas procedentes de individuos control. Además el residuo Ala128 se encuentra altamente conservado en todas las isoformas de la filamina en eucariotas. Estos resultados

excluyen que el cambio identificado sea un polimorfismo y apoyan que se trata de la mutación responsable del fenotipo.

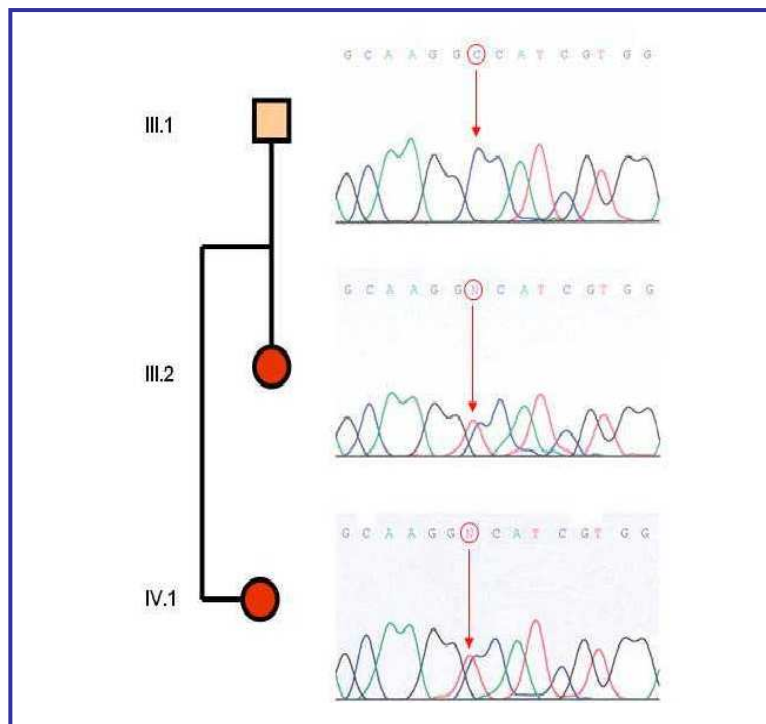


Figura 20. Mutación de *FLN1A*. El análisis de secuenciación mostró el cambio c.383C>T en el exón 3 del gen. Se muestran los cromatogramas del individuo III-1 (control sano), III-2 y IV-1 (afectos y portadores del alelo mutado). El cambio CT presente en heterocigosis en los individuos afectados aparece señalado por una flecha.

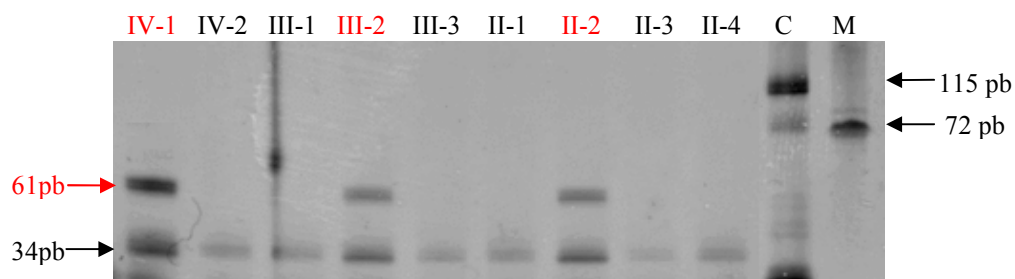


Figura 21. Análisis RFLPs. Gel de poliacrilamida mostrando el ADN genómico de los individuos de la familia amplificado y digerido con el enzima *Hae* III. La mutación c.383C>T elimina un sitio de restricción del enzima por lo que los individuos afectados muestran un fragmento más largo (de 61 pb). C: Muestra control no digerida de la PCR, M: Marcador de tamaño. Los individuos afectados aparecen señalados en rojo.

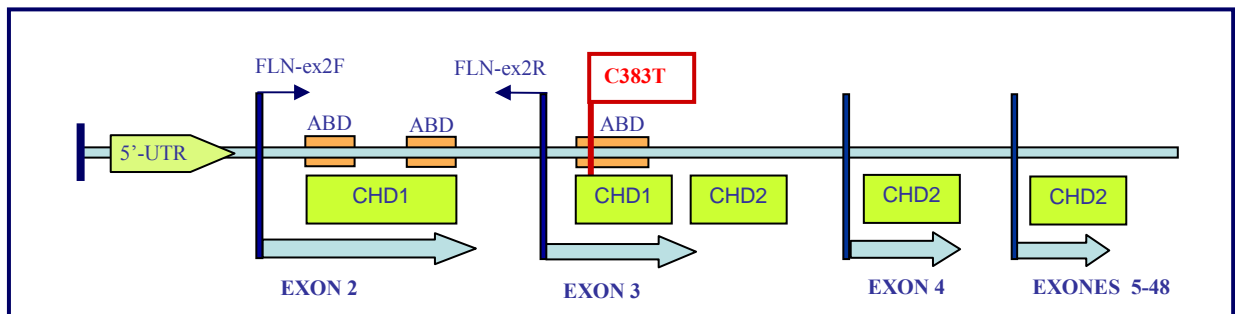


Figura 22. Estructura del gen de la filamina A. Localización de la mutación c.383C>T
ABD: Dominio de unión a la actina, CHD1 y CHD2: Dominios de homología con la calponina

5. DISCUSSION

5.1 FAMILIA AAE

La familia AAE es de enorme interés clínico ya que representa un **nuevo síndrome epiléptico familiar**. La expresividad clínica es muy variable existiendo desde portadores asintomáticos a pacientes con formas severas y refractarias de epilepsia. La penetrancia es incompleta y se sitúa en torno al 55%. Entre los pacientes 6 fueron mujeres y 5 varones. No hubo diferencias en la expresión clínica entre sexos.

Las características de este nuevo síndrome epiléptico se resumen a continuación.

Aspectos clínicos

Características de la epilepsia

La edad de inicio fue variable con un rango de edades entre los 2 y los 62 años, preferentemente en torno a la infancia tardía y adolescencia (entre los 9 y los 18 años de edad). No se observaron diferencias clínicas entre las sucesivas generaciones ni diferencias sexuales en la expresión clínica de la enfermedad.

Se trata de una **epilepsia mioclónica familiar fotosensible con crisis generalizadas tónico-clónicas, mioclonías y crisis focales versivas que evolucionan frecuentemente a estados epilépticos parciales refractarios a medicación**. Los individuos más representativos, los que expresan un cuadro clínico más estereotipado, son los individuos identificados según el pedigree como III-7 (probando), II-10, III-1 y III-2.

Tipos de crisis

La epilepsia se caracteriza por la presencia de crisis parciales (fundamentalmente crisis motoras de tipo versivo) y crisis generalizadas (tónico-clónicas y mioclonías) de aparición espontánea e inducida ante estímulos luminosos.

Crisis parciales: 5 de los 11 pacientes (45,4%) presentaron crisis parciales simples motoras versivas consistentes en desviación forzada de los ojos, cabeza y cuello en una dirección (indistintamente hacia la derecha o hacia la izquierda), seguidas de sacudidas clónicas faciales y/o cefálicas en la misma dirección. Estas crisis fueron breves, no se acompañaron de alteración del nivel de conciencia ni de confusión postcrítica. Se observó una tendencia a evolucionar hacia crisis tónicas asimétricas y crisis generalizadas tónico-clónicas. Se mostraron sensibles a estímulos luminosos desencadenándose ante cambios bruscos de luz y cediendo en la oscuridad. Tienden a presentarse en acúmulos dando lugar a estados epilépticos parciales de horas e incluso días de duración lo que ha conducido en algunos de los pacientes a numerosos ingresos

hospitalarios e incluso al fallecimiento a causa de complicaciones derivadas de esta situación.

La semiología clínica de estas crisis sugiere un origen frontal. Los movimientos de versión óculo-cefálica se originan a nivel del campo ocular frontal situado en el área premotora de la corteza frontal dorsolateral (área 8 y parte de las áreas 6 y 9 de Brodman) y del campo ocular suplementario (situado en posición rostral al área motora suplementaria en la corteza frontal dorsomedial). La estimulación de estas áreas induce un movimiento ocular lento o sacádico seguido de un movimiento versivo de la cabeza e incluso del tronco hacia el lado opuesto [*Godoy J y col, 1990*]. También a nivel de la corteza estriada del lóbulo occipital pueden originarse movimientos versivos, aunque lo más frecuente es que se precedan de síntomas visuales si el origen es occipital y que los movimientos versivos en sí se generen por propagación de la actividad crítica a regiones frontales. Si bien es cierto que no es posible descartar por completo una respuesta occipital refleja que se propague rápidamente al lóbulo frontal, lo cierto es que no hemos encontrado ninguna evidencia clínica (no hay síntomas visuales al inicio de las crisis) ni electroencefalográfica (no hay respuesta fotoparoxística occipital ni anomalías occipitales ictales) en estos pacientes que sustente esta teoría. La corta duración de las crisis, la ausencia o mínima confusión postictal, la presencia de una postura tónica asimétrica de las extremidades y la frecuente tendencia a la generalización son datos adicionales que apoyan el origen frontal. Además el registro electroencefalográfico durante estas crisis mostró una actividad rítmica ictal en la región frontocentral o rolándica (**figura 5c y figura 7**). En resumen; tanto la semiología clínica como los hallazgos del electroencefalograma avalan un origen frontal de estas crisis versivas.

Una condición sorprendente y muy característica de estas crisis es la fotosensibilidad. Si bien es conocido que las crisis frontales se activan durante el sueño, tal y como sucede en la epilepsia nocturna frontal autosómica dominante, no hemos encontrado ninguna referencia de epilepsia frontal fotosensible y/o de crisis frontales inducidas frente a estímulos luminosos. El mecanismo fisiopatológico por el que estímulos visuales podrían inducir crisis frontales es difícil de entender aunque la implicación de los circuitos frontales en los mecanismos de fotosensibilidad ha sido propuesta previamente [*Kapucu LO y col, 1996*]. Es posible que tanto la hiperexcitabilidad del cortex frontal específica de este síndrome epiléptico como la importancia de las aferencias visuales al lóbulo frontal jueguen un papel importante.

Al margen de las crisis parciales versivas dos de los pacientes (individuos III-2 y II-3) presentaron crisis parciales complejas sugerentes de un origen temporal.

En resumen; las crisis parciales observadas en este síndrome epiléptico son en su mayoría y característicamente **crisis parciales motoras versivas fotosensibles. Tanto la semiología clínica como el electroencefalograma sugieren un origen frontal.** No se han evidenciado en las pruebas de imagen anomalías corticales subyacentes. En el contexto de la variación mitocondrial encontrada y presumiendo su valor patogénico, la hiperexcitabilidad del cortex frontal podría ser secundaria al daño ocasionado por un déficit metabólico en un área cerebral de elevado consumo energético.

Mioclónías: Las mioclónías aparecieron en 7 de los 11 pacientes (63,6%) y constituyen el segundo tipo de crisis más frecuente después de las crisis generalizadas tónico-clónicas. En 5 de los 11 individuos afectados (45,4%) fueron el síntoma de inicio de la epilepsia. Se observaron mioclónías palpebrales, de la cabeza, parcelares y masivas de las extremidades de predominio en miembros superiores. No presentaron preferencia horaria, sucedieron frecuentemente en salvas y de forma refleja ante estímulos luminosos cotidianos; principalmente cambios bruscos en la intensidad de la luz tales como encender las luces de una habitación o percibir los rayos del sol a través de una persiana o a través de una fila de árboles. Ceden en la oscuridad. Se trata por lo tanto de **mioclónías multifocales fotosensibles.** El electroencefalograma mostró descargas generalizadas de polipunta y polipunta-onda en relación con estas mioclónías.

Las mioclónías fotosensibles se han observado en otros síndromes epilépticos tales como las epilepsias idiopáticas generalizadas y las epilepsias mioclónicas progresivas. Las mioclónías propias de las epilepsias generalizadas idiopáticas son por lo general bilaterales y masivas (como sucede por ejemplo en la epilepsia mioclónica juvenil). En las epilepsias mioclónicas progresivas (como por ejemplo en la enfermedad de Unverricht-Lundborg o en la enfermedad de Lafora) es más típico observar un mioclono multifocal que se agrava con la evolución clínica de la enfermedad de tal forma que las mioclónías masivas aparecen en las fases tardías, siendo cada vez mas frecuentes y más invalidantes para el paciente en actividades básicas como la alimentación o la deambulación. En la familia estudiada coexisten mioclónías parcelares multifocales con mioclónías masivas lo que la distingue de las epilepsias idiopáticas generalizadas. Por otra parte, las mioclónías no muestran la evolución progresiva e invalidante características de las epilepsias mioclónicas progresivas. Se trata por lo tanto

de una situación intermedia, si bien podría considerarse más próxima (por el tipo de mioclonias y su frecuencia) a las epilepsias mioclónicas progresivas.

Crisis generalizadas tónico-clónicas: Las crisis generalizadas tónico-clónicas primarias y crisis parciales secundariamente generalizadas aparecieron en 9 de los 11 individuos afectos (81,8%). Constituyen el tipo de crisis epiléptica más frecuente, aunque no el más característico. En 4 de los 5 pacientes que presentaron crisis parciales motoras simples versivas (80%) fue frecuente la evolución de las crisis hacia la generalización tónico-clónica secundaria.

Fotosensibilidad

Un rasgo característico de esta epilepsia familiar es la fotosensibilidad. La prevalencia global de la fotosensibilidad se sitúa en torno al 5,5% de todas las epilepsias. Son fotosensibles un 21% de las epilepsias idiopáticas generalizadas, un 5,1% de las epilepsias generalizadas sintomáticas o criptogénicas y solo el 2,8% de las epilepsias parciales [Harding *GFA y col*, 1994]. Por lo tanto la epilepsia fotosensible es en la mayoría de las ocasiones una epilepsia generalizada idiopática. Las epilepsias con crisis focales fotosensibles (como las descritas en esta familia) constituyen un fenómeno poco común.

En cuanto a las epilepsias generalizadas idiopáticas la epilepsia generalizada idiopática más frecuentemente asociada a fotosensibilidad es la epilepsia mioclónica juvenil (hasta un 30% de los pacientes con EMJ muestran esta condición), siendo otras la epilepsia con ausencias y mioclonias palpebrales (síndrome de Jeavons), la epilepsia con ausencias de la infancia y la epilepsia con crisis generalizadas tónico-clónicas.

Dentro del grupo de las epilepsias generalizadas sintomáticas o criptogénicas con fotosensibilidad se incluyen la epilepsia mioclónica severa de la infancia, la epilepsia mioclono-astática y las epilepsias mioclónicas progresivas.

Las crisis parciales fotosensibles son como hemos comentado infrecuentes. La revisión de la literatura científica a este respecto muestra que son muy pocas las referencias y heterogéneas las características clínicas de los pacientes con crisis focales y fotosensibilidad. En la mayoría de los casos se trata de crisis reflejas occipitales asociadas o no a lesión estructural. Algunos de estos pacientes presentan una forma de epilepsia occipital idiopática fotosensible, tal y como definió el grupo de Guerrini en 1995 en base al estudio de 10 pacientes. Esta epilepsia se inicia en la infancia-adolescencia, se caracteriza por la aparición de crisis occipitales reflejas fotosensibles que se inician con síntomas visuales, seguidas de cefalea, malestar epigástrico y

vómitos (estos últimos síntomas secundarios a la propagación, frecuente, al lóbulo temporal). El electroencefalograma muestra una actividad de fondo normal y una respuesta fotoparoxística occipital, generalizada o ambas. La evolución, como en la mayoría de las epilepsias idiopáticas, es benigna.

Además se han descrito de forma aislada casos de pacientes con crisis temporales inducidas por estímulos visuales [Benbadis SR y col, 1996] [Isnard J y col, 1998] [Fiore LA y col, 2003]. Sin embargo no se ha encontrado ningún caso de crisis frontales fotosensibles en el humano. **Teniendo en cuenta estos datos, la asociación de crisis frontales y fotosensibilidad en la familia que hemos estudiado constituye un hecho interesante y excepcional.**

Los mecanismos fisiopatológicos de la fotosensibilidad en epilepsia no son bien conocidos. Los estudios electroclínicos realizados en el babuino Papio Papio procedente de Senegal y que representa el modelo animal de epilepsia fotosensible más estudiado muestran diferencias con el humano. Mientras que en el primate la respuesta fotoparoxística se localiza en la corteza frontal (la estimulación luminosa intermitente induce descargas bifrontorolándicas con tendencia a la generalización) [Menini C et al, 1998] en el humano la actividad ictal podría originarse en el cortex visual pudiendo limitarse a la región occipital o extenderse a otras áreas corticales [Binnie CD, 1994] [Hennesy MJ et al, 2000] [Wilkins AJ et al, 2004]. Sin embargo la implicación de los circuitos frontales en las epilepsias fotosensibles del humano ha sido propuesta previamente por el grupo de Kapucu. Este autor estudió 7 pacientes con una epilepsia fotosensible pura y crisis inducidas por la televisión mediante SPECT interictal e ictal. Este trabajo mostró un patrón común de hipoperfusión frontal en el estudio interictal e hiperperfusión de áreas frontales durante las crisis. No se observaron cambios a nivel de regiones occipitales. Los resultados de este estudio llevaron a sus autores a sugerir que los lóbulos frontales están implicados en la generación de crisis fotosensibles en el humano, sin poder descartar que impulsos visuales y aferencias procedentes de áreas occipitales funcionen como precipitantes [Kapucu LO y col, 1996].

La fotosensibilidad se hereda. La fotosensibilidad es un fenómeno genéticamente determinado, aunque por el momento se desconocen los genes implicados. La mayoría de las familias con epilepsia y fotosensibilidad son familias con epilepsias idiopáticas generalizadas que siguen un patrón de herencia autosómico dominante, lo que ha llevado a pensar que existen factores genéticos comunes entre estas epilepsias y la fotosensibilidad y a centrar la búsqueda conjunta de genes

[Stephani U y col, 2004]. Sin embargo la fotosensibilidad también se ha observado en epilepsias mioclónicas progresivas (ejemplos son la ceroidlipofuscinosis, la enfermedad de Unverricht-Lundborg o la enfermedad de Lafora) que presentan un modo de herencia autosómico recesivo. **La familia que describimos en esta tesis muestra una herencia materna de origen mitocondrial, lo cual sugiere que la fotosensibilidad podría heredarse también por esta vía.** La asociación de epilepsia y fotosensibilidad está descrita en pacientes con desórdenes mitocondriales tipo MERRF, MELAS y formas solapadas de ambos síndromes [Canafoglia L y col, 2001]. El mecanismo por el cual trastornos mitocondriales dan lugar a una epilepsia con fotosensibilidad no es conocido. Hasta el momento no se ha identificado ningún gen ni grupo de genes implicados directamente en los mecanismos de fotosensibilidad. Recientemente se ha propuesto un gen, el NEDD4-2 (Neuronally Expressed Developmentally Downregulated 4) como un posible candidato. Este gen codifica para una proteína ubiquitina ligasa que podría regular la expresión en la membrana celular de numerosas proteínas, incluyendo canales iónicos (canales de sodio dependientes de voltaje), proteínas transportadoras y receptores implicados en los mecanismos de excitabilidad neuronal. El grupo de Dibbens y col encontró 3 variaciones de cambio de sentido en residuos conservados de este gen en familias con epilepsias generalizadas idiopáticas y fotosensibilidad. El análisis funcional no mostró alteraciones en la interacción de esta variante con el canal de sodio dependiente de voltaje por lo que según los autores, la fotosensibilidad en estas familias podría derivarse de la interacción de este gen con otras proteínas [Dibbens LM y col, 2007].

En el caso de la familia que hemos estudiado la hipótesis que establecemos es que el defecto mitocondrial encontrado ocasiona un daño metabólico y una hiperexcitabilidad secundarias en las zonas de la corteza cerebral de mayor consumo metabólico. Tanto el cortex frontal como el visual son áreas corticales de elevado consumo. La hiperexcitabilidad del cortex frontal y de las vías visuales y sus aferencias al lóbulo frontal podrían explicar la presencia de crisis parciales frontales fotosensibles en estos pacientes.

Hallazgos de las pruebas complementarias:

Electroencefalogramas:

Los estudios de electroencefalograma fueron revisados en 7 de los 11 individuos afectados y no estuvieron disponibles en 4 pacientes.

Se observó una lentificación de la actividad de fondo en todos los individuos. Se detectaron anomalías epileptiformes heterogéneas en forma de ondas agudas, puntas, complejos de punta-onda y polipunta-onda de expresión focal (predominantemente en regiones temporales) y generalizada.

La estimulación luminosa intermitente indujo una respuesta fotoparoxística documentada en 4 de 7 pacientes (individuos III-1, III-2, III-7 y III-9) en forma de descargas generalizadas de polipunta-onda a frecuencias entre 10 y 50 Hz. No se detectaron anomalías epileptiformes occipitales espontáneas ni en respuesta a la ELI.

Se obtuvieron registros ictales en 4 individuos (individuos III-1, III-2, III-7 y III-9). El electroencefalograma durante crisis mioclónicas y generalizadas tónico-clónicas (individuos III-1, III-7 y III-9) mostró descargas de punta-onda y polipunta-onda generalizada. El individuo III-2 presentó una crisis versiva izquierda durante un EEG de rutina con correlato de una actividad delta de bajo voltaje seudorítmica en la región fronto-rolándica derecha (**figura 7**). El registro ictal durante un estatus epiléptico parcial versivo en la probando (III-7) mostró una actividad rítmica de puntas a nivel frontocentral (**figura 5c**). Por último, los registros realizados durante un estatus epiléptico en el individuo III-1 mostraron una actividad continua de punta y polipunta-onda generalizada. No se dispone de estudios de video-EEG.

Pruebas de imagen cerebral

Las pruebas de imagen cerebral fueron revisadas en 7 de los 11 pacientes y no estuvieron disponibles en 4. Se observó una atrofia cortical en 3 individuos (III-7, II-10 y III-13). En el individuo III-13 se detectó además una porencefalia extensa, sin que se conozcan más detalles en cuanto a su tamaño y localización, ya que no pudieron revisarse las imágenes. Aunque no podemos descartar en este paciente que la lesión fuese en realidad una secuela de una complicación perinatal no documentada, sugerimos a partir de esta observación que el trastorno mitocondrial pueda ser el causante de la porencefalia y de otras malformaciones del desarrollo cortical al inducir un déficit metabólico en etapas precoces del desarrollo.

Evolución y pronóstico

La evolución de la epilepsia fue muy heterogénea. Algunos pacientes presentaron una única crisis (individuo II-2), otros han mantenido una situación clínica estable durante años y en otros individuos la evolución ha sido hacia el empeoramiento con crisis refractarias a múltiples tratamientos y frecuentes ingresos por estados epilépticos (individuos II-10, III-1, III-2, III-7 y III-13). Cuatro pacientes (II-10, III-1,

III-2 y III-7) precisaron politerapia con más de cuatro fármacos antiepilépticos. Cuatro pacientes fallecieron a consecuencia de complicaciones derivadas de su epilepsia (II-10, III-1, III-7 y III-13). El individuo II-7 falleció en su domicilio. Aunque no se pudo determinar la causa del fallecimiento ya que no se realizó estudio de autopsia se sospecha que ocurrió tras una crisis. En la actualidad 5 pacientes continúan seguimiento regular por neurólogo (I-2, II-3, II-21, III-2 y III-9). Un paciente continúa con crisis frecuentes a pesar de la politerapia (III-2), 2 pacientes (II-21, III-9) se encuentran sin medicación antiepiléptica en el momento del estudio por diferentes motivos (control parcial de las crisis, negativa a tomar la medicación). En 2 pacientes se desconoce el estado actual del tratamiento (I-2, II-3).

Signos clínicos asociados

Al margen de la epilepsia se observó:

- Retraso psicomotor en 4 individuos (III-2, III-7, III-9 y III-13) y deterioro neurológico progresivo en 1 individuo (II-10)
- Trastornos de conducta y alteraciones psiquiátricas en 6 individuos (II-3, II-7, II-10, III-1, III-2 y III-7) incluyendo ansiedad, depresión y otras no bien documentadas. Es interesante conocer que diversos autores han relacionado trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, la depresión y el trastorno bipolar con alteraciones mitocondriales [Jou SH et al, 2009]. Así mismo se sabe que estos trastornos psiquiátricos se asocian a un funcionamiento anormal de la corteza prefrontal. Dado que la mayoría de los pacientes con alteraciones psiquiátricas fueron pacientes con epilepsia refractaria y que las crisis versivas se originan precisamente en la corteza frontal podríamos pensar que la patología psiquiátrica fuera secundaria a la propia epilepsia o bien a la combinación de ambos factores (el malfuncionamiento mitocondrial y la epilepsia refractaria).
- Temblor postural en 5 individuos (I-2, II-10, III-1, III-7 y III-9)
- Migrañas en 3 afectados de epilepsia (II-10, II-21, III-9) y en 2 portadores sanos (II-5, III-8)
- Ptosis y Trastornos oculomotores inespecíficos en 2 individuos (II-2, III-1)
- Hipoacusia neurosensorial en 2 individuos (II-7 y II-10)

No se evidenció ataxia ni otros datos de enfermedad sistémica en la familia.

En resumen:

Se describe una nueva epilepsia mioclónica familiar.

Las características de este síndrome epiléptico son:

- Una edad de inicio variable, preferentemente en la adolescencia y edad adulta temprana
- Heterogeneidad clínica intrafamiliar
- Presencia de crisis versivas, crisis generalizadas tónico-clónicas y mioclonías
- Frecuente evolución a estados epilépticos parciales, convulsivos y mioclónicos
- Marcada fotosensibilidad
- Refractariedad al tratamiento
- Electroencefalograma con anomalías epileptiformes focales (de predominio en áreas temporales y rolándicas) y generalizadas heterogéneas (ondas agudas, puntas, complejos de punta-onda y polipunta-onda)
- Presencia de síntomas asociados como trastornos psiquiátricos, retraso psicomotor, temblor postural, migrañas, ptosis, alteraciones inespecíficas de la motilidad ocular y sordera neurosensorial
- Pronóstico variable

Aspectos genéticos

Modo de herencia

El estudio del árbol familiar mostró un patrón de herencia materna en la que las mujeres transmitieron la enfermedad a todos sus hijos, tanto varones como mujeres, mientras que ninguno de los varones afectados transmitieron la enfermedad a su descendencia. Este tipo de herencia es característica de los trastornos del ADN mitocondrial.

¿Qué hizo sospechar una enfermedad mitocondrial?

Tanto la herencia materna como el cuadro clínico (epilepsia mioclónica asociada a retraso psicomotor, trastorno psiquiátrico, migrañas y sordera neurosensorial) hicieron sospechar un desorden mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales constituyen un extenso grupo de enfermedades del metabolismo oxidativo. Son trastornos multisistémicos con especial predilección por el sistema nervioso y músculoesquelético cuya expresión abarca un amplio espectro de síndromes clínicos. Dos son los síndromes mitocondriales clásicamente asociados a

epilepsia: el síndrome de MERRF, cuyas siglas hacen referencia a Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojo Rasgadas (FRR) y el síndrome de MELAS, cuyas siglas evocan la presencia de Miopatía, Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares o Strokes (en referencia al inglés). El síndrome de MERRF [Fukuhara y col, 1980] se manifiesta clásicamente por una epilepsia mioclónica progresiva con crisis mioclónicas y crisis generalizadas tónico-clónicas. En la epilepsia asociada al síndrome MELAS [Pavlakís SG y col, 1984] sin embargo, son más frecuentes las crisis focales con síntomas motores, que pueden presentarse en acúmulos dando lugar a un estado parcial motor o epilepsia parcial continua. Ambas epilepsias presentan similitudes con la familia que hemos estudiado. Tanto el tipo de crisis (mioclonias, crisis focales motoras) como la refractariedad son rasgos comunes en las epilepsias asociadas a citopatías mitocondriales.

También la fotosensibilidad, presente en esta familia, constituye una característica de la epilepsia asociada a desórdenes mitocondriales. Aproximadamente un 25% de los pacientes con síndrome de MERRF muestran una respuesta fotoparoxística en los electroencefalogramas [So N y col, 1989]. Más aún, la asociación de fotosensibilidad y crisis parciales motoras, como es el caso de la familia que hemos estudiado, es un hallazgo excepcional. Algunos autores han sugerido que éste podría ser un rasgo marcador de encefalopatías mitocondriales [Canafoglia L y col, 2001].

Otras manifestaciones clínicas asociadas comúnmente a defectos mitocondriales son el deterioro cognitivo, ataxia, migrañas, talla baja, atrofia óptica y sordera neurosensorial. En el caso de la familia estudiada, se han observado retraso psicomotor, alteraciones conductuales y psiquiátricas, trastornos oculomotores, migrañas y sordera neurosensorial en varios individuos de la familia. La coincidencia de estos síntomas va nuevamente a favor de una enfermedad mitocondrial.

En dos de los individuos afectados (II-10 y III-9) se indicó la realización de una biopsia muscular. El estudio con el microscopio óptico y electrónico no detectó la presencia de fibras rojas rasgadas marcadoras de enfermedad mitocondrial, si bien éstas solo están presentes en un porcentaje bajo de casos. Sin embargo el estudio de la cadena respiratoria en la hermana de la probando (III-9) evidenció un complejo IV ligeramente descendido, dato que apoya la sospecha diagnóstica.

En resumen: tanto el cuadro clínico (epilepsia mioclónica con crisis parciales motoras versivas refractarias, junto con retraso psicomotor, sordera neurosensorial y migrañas) como la herencia materna y los resultados del estudio enzimático de la

cadena respiratoria en la hermana de la probando apoyan el diagnóstico de sospecha de citopatía mitocondrial.

Hallazgos del estudio molecular

El análisis molecular por secuenciación directa del ADN mitocondrial mostró un cambio de nucleótido (A>G) a nivel del residuo 5793 del gen codificante para el ARN de transferencia de cisteína mitocondrial (*TRNC*). Esta variación (5793A>G) no estuvo presente en las muestras analizadas procedentes de 4000 individuos sanos lo que sugiere que podría tratarse una mutación. Además afecta a un residuo altamente conservado de la proteína, lo que podría implicar una alteración de su función. **Hasta la fecha no se ha descrito ninguna mutación en este gen asociada a enfermedad o patología humana.** Sin embargo mutaciones en genes que codifican para otros ARN de transferencia se han asociado a síndromes mitocondriales específicos como el síndrome de MELAS y el síndrome de MERRF. El 80% de los casos de MELAS se asocian a una mutación puntual de cambio de nucleótido (3243 A→G) en el gen codificante para el ARNt de leucina (*MTTL1*) [Kobayashi Y y col, 1991] [Goto Y y col, 1992] mientras que el 80% de los casos de síndrome de MERRF asocian mutaciones puntuales de cambio de nucleótido (8344 A→G) en el gen codificante para el ARNt de lisina (*MTTK*) [Shoffner JM y col, 1990] [Yoneda M y col, 1990]. Una minoría de pacientes afectados de MELAS, MERRF y formas solapadas de ambos síndromes se han asociado a mutaciones en genes codificantes para otros ARN de transferencia: de histidina (*MTTH*), fenilalanina (*MTTF*) o serina (*MTTS*).

Dado que la variación encontrada (que curiosamente produce un cambio de nucleótido A→G idéntico al observado en los casos de MELAS y MERRF) afecta también a un ARN de transferencia y que el cuadro clínico se asemeja a las enfermedades mitocondriales descritas, pensamos que **la familia estudiada representa una nueva forma de encefalopatía mitocondrial.**

En la actualidad se está trabajando en la obtención de células de fusión que permitan conocer los cambios funcionales que ocasiona esta variación y que confirmen el valor patogénico de la misma (Dra. Esther Gallardo, Instituto de investigaciones biomédicas Alberto Sols, Facultad de Medicina de la UAM).

5.2 FAMILIA EIG-24

Aspectos clínicos

Se trata de una extensa familia compuesta por 69 individuos a lo largo de cuatro generaciones en la que se encontraron 22 individuos afectados de epilepsia. El fenotipo de la epilepsia fue compatible con una epilepsia generalizada con crisis febriles plus o síndrome de GEFS+.

Los fenotipos más frecuentes fueron las *crisis febriles* y las *crisis febriles plus* presentes en 9 de 22 individuos afectados (40,9%), seguidos de las *crisis febriles plus con ausencias* en 3 de 22 individuos (13,36%). El resto de fenotipos observados en esta familia fueron: crisis febriles plus con mioclonias en 1 individuo, formas no específicas de epilepsia generalizada sin crisis febriles en 3 individuos y epilepsia temporal en 1 individuo. Los tres individuos con epilepsias generalizadas presentaron crisis generalizadas tónico-clónicas solo o crisis generalizadas tónico-clónicas con ausencias sin crisis febriles asociadas. La epilepsia en estos individuos no mostró un patrón específico compatible con ninguna de las formas de epilepsia generalizada idiopática definidas en la clasificación de las epilepsias y síndromes epilépticos de la ILAE (Liga Internacional Contra la Epilepsia). Ninguno de estos casos se comportó como una epilepsia intratable de la infancia con crisis generalizadas tónico-clónicas como se ha observado en otras familias con GEFS+. La información clínica disponible no fue suficiente para clasificar la epilepsia en 5 individuos (*I-2*, *II-17*, *III-3*, *III-30*, *IV-5*). La ausencia de testigos así como la dificultad de acceso a una atención neurológica especializada en las primeras generaciones, en los adultos de mayor edad y en determinados entornos, son la causa de que algunos datos clínicos sean imprecisos y de que no se haya podido definir con exactitud el fenotipo de la epilepsia en estos individuos.

El **inicio de la epilepsia fue en la infancia**, con una edad media de 3.5 años y un rango de edades comprendidas entre los 9 meses y los 12 años de edad. No hubo ningún caso de debut tras la administración de vacunas.

La exploración neurológica fue normal en todos los individuos afectados a excepción de tres: uno de ellos no portador de la mutación y considerado por lo tanto una fenocopia (*III-3*), el segundo con secuelas cognitivas tras sufrir ahogamiento en piscina a causa de una crisis (*III-11*) y el tercero con un retraso psicomotor moderado

secundario a asfixia perinatal (III-30).

Existe una **gran variabilidad en la expresión clínica de la epilepsia** entre los individuos de la familia. Este es un rasgo extensamente descrito en otras familias y característico de este síndrome epiléptico. El amplio espectro clínico engloba desde crisis febriles típicas aisladas hasta formas severas de epilepsia tales como la epilepsia mioclono-astática (EMA), la epilepsia mioclónica severa de la infancia (EMSI) o la epilepsia intratable de la infancia con crisis generalizadas tónico-clónicas. Esta variabilidad se refleja así mismo en una evolución y pronóstico de la epilepsia muy heterogéneos. En la familia EIG-24 las crisis remitieron (considerando remisión la ausencia de crisis en los últimos 5 años) en 7 individuos (31,8%), persistieron de forma esporádica en 10 individuos (45,4%) y se mostraron refractarias a tratamiento en 3 individuos (13,6%). Dos de los tres individuos con epilepsia refractaria (III-11 y III-30) presentaban secuelas de encefalopatía hipóxica secundaria al ahogamiento en piscina (III-11) y a sufrimiento fetal agudo perinatal (III-30). No se identificó ningún caso de epilepsia severa de la infancia.

Los mecanismos implicados en esta variabilidad inter e intrafamiliar no son bien conocidos. Se han planteado varias hipótesis:

- por un lado la influencia de factores ambientales en la expresión de la enfermedad
- por otro lado la existencia de genes modificadores de la enfermedad.

Es decir que el fenotipo de un paciente estaría condicionado por la influencia e interacción de múltiples genes. En el caso concreto de esta familia existiría un gen dominante (*SCN1A*) cuya mutación condiciona la epilepsia asociada a crisis febriles y genes o alelos modificadores de la enfermedad que influirían en la expresión del fenotipo concreto en cada individuo. A pesar de que ésta es una idea muy extendida, los trabajos dirigidos a identificar estos genes modificadores son muy escasos. Como un ejemplo de esto el grupo de Baulac y colaboradores presentó en el año 2001 una familia de origen francés con crisis febriles y epilepsia temporal en la que se evidenció un doble ligamiento a la región 18qter y 1q25-q31 con haplotipos comunes en ambas regiones para todos los individuos afectados lo que llevó a sugerir a estos autores la presencia de una herencia digénica responsable del fenotipo característico de esta familia [Baulac S y col, 2001]. Además, recientemente el grupo de Escayg demostró en un modelo de ratón de epilepsia mioclónica severa de la infancia cómo el gen *SCN8A* se comporta como un gen modificador. Para ello compararon el fenotipo de ratones portadores de una doble

mutación en *SCN1A* y *SCN8A* en heterocigosis con ratones portadores de una sola mutación en *SCN1A*. El estudio de estos animales mostró una mayor resistencia a las crisis y un incremento de la supervivencia en los ratones portadores de la doble mutación con respecto a los portadores de una única mutación en *SCN1A*. Este hecho demuestra que existen variantes de genes (en este caso el *SCN8A*) que influyen en la expresión y severidad de la epilepsia [Martin MS y col, 2007].

En resumen: Esta familia presenta una epilepsia generalizada con crisis febriles plus típica y caracterizada por:

- **Inicio en la infancia**
- **Presencia simultánea de crisis febriles y crisis afebriles, generalizadas y focales, siendo los fenotipos más frecuentes las crisis febriles y las crisis febriles plus con crisis generalizadas tónico-clónicas y ausencias**
- **Gran heterogeneidad clínica intrafamiliar**
- **Examen neurológico y pruebas imagen cerebral normales**
- **Anomalías epileptiformes en el electroencefalograma generalizadas en forma de punta-onda y polipunta-onda de morfología irregular y frecuencia variable (generalmente > 3 Hz) y focales de predominio temporal.**
- **Pronóstico variable**

Hay dos rasgos clínicos que al margen de la epilepsia distinguen a esta familia de otras descritas en la literatura científica: el primero de ellos es la presencia de trastornos psiquiátricos e intentos autolíticos y el segundo la muerte súbita.

Trastornos psiquiátricos y epilepsia

Encontramos antecedentes de trastorno depresivo en al menos 5 individuos (*II-5, II-13, III-8, III-15, III-18*) e intentos autolíticos en 4 individuos (*II-7, III-8, III-11, III-16*) de la familia; todos ellos afectados de epilepsia y portadores de la mutación a excepción de uno (*III-16*).

A este respecto se ha descrito recientemente una familia con GEFS + asociada a una nueva mutación en *SCN1A* en la que se observaron síntomas psiquiátricos (trastorno ansioso-depresivo) y ataxia [Mahoney K y col, 2009]. Aunque la asociación de la epilepsia con trastornos psiquiátricos ha sido descrita en numerosas ocasiones, éste es el único trabajo que hemos encontrado referente a una familia con GEFS + y mutaciones en *SCN1A*. No hay sin embargo referencias que vinculen intentos autolíticos a este tipo de

epilepsia y/o a mutaciones en *SCN1A*.

La relación de la patología psiquiátrica con la epilepsia es difícil de establecer. Nuestra impresión, más que pensar que los síntomas ansioso-depresivos sean consecuencia de la epilepsia, es que ambos trastornos coexisten en la misma familia. Esto apunta a que pudieran existir factores genéticos de susceptibilidad comunes. No disponemos de argumentos que expliquen la conexión entre los síntomas psiquiátricos y la mutación en *SCN1A* asociada a esta epilepsia familiar. Podría cuestionarse la posible existencia de un gen adicional implicado en las manifestaciones psiquiátricas o si es la propia mutación en *SCN1A* la responsable de estos síntomas. También es interesante la discusión de si mutaciones en este canal podrían estar implicadas en la falta de control de impulsos subyacente a los intentos autolíticos. Cabe la posibilidad también de la influencia de factores ambientales y de una simple coincidencia de ambas patologías en la misma familia. Por ello consideramos importante en el futuro hacer más observaciones al respecto e intentar definir mejor la patología psiquiátrica en esta forma de epilepsia.

Otro aspecto diferenciador en esta familia es la presencia de muerte súbita en cuatro pacientes, aspecto que resulta de enorme importancia y que se expone a continuación.

Muerte súbita y epilepsia

Cuatro individuos (*II-7*, *II-17*, *III-9* y *III-10*), tres de ellos con epilepsia conocida, presentaron una muerte súbita. Los individuos *II-7* y *II-17* fallecieron de manera inesperada en casa. Se realizó estudio de autopsia en uno de ellos (*II-17*) que no determinó causa del fallecimiento. Los otros dos pacientes (*III-9* y *III-10*) presentaron una muerte súbita durante el sueño a los 2 años de edad. No se realizó estudio de autopsia.

La muerte súbita en pacientes epilépticos se conoce con el acrónimo SUDEP en referencia al inglés (sudden unexpected death in epilepsy) y se define como aquella muerte ocurrida de forma súbita, inesperada, en presencia o ausencia de testigos, con o sin evidencia de crisis y en la que se han excluido estados epilépticos, complicaciones derivadas de traumatismos y ahogamiento así como otras posibles causas de muerte (estructurales o tóxicas) en el estudio postmortem [Nashef L, 1996 y 1998] [Leestma JE, 1997].

El riesgo de muerte súbita en la población general es <1/1000. Sin embargo en pacientes epilépticos se describen 1-2 casos por cada 1000 pacientes al año [Walczak

TS, 2001] [Mohanraj R, 2006] [Ficker DM, 2000]. La muerte súbita explica entre el 2 y el 18% de las muertes en pacientes epilépticos.

Se han identificado varios factores de riesgo asociados a la muerte súbita en epilepsia. Estos incluyen, entre otros, una edad de inicio temprana de la epilepsia, crisis generalizadas tónico-clónicas frecuentes y refractariedad al tratamiento [Walczak TS, 2001] [Nilsson L, 1999].

Las causas y mecanismos fisiopatológicos de la muerte súbita asociada a epilepsia son inciertos y posiblemente heterogéneos. Se han propuesto complicaciones cardiológicas (arritmias cardíacas), respiratorias (apneas centrales, laringoespasmo) y neurológicas (edema pulmonar neurogénico) como posibles responsables [Nashef L, 1996]. La mayoría de los autores piensa que las arritmias cardíacas sucedidas durante las crisis o en el periodo postcrítico constituyen el principal mecanismo.

La asociación familiar de muerte súbita y epilepsia es inusual. Hasta el momento solo se ha descrito una familia afecta de GEFS + y una mutación de *SCN1A* en la que dos pacientes sufrieron una muerte súbita durante el sueño. Aunque no se pudo obtener ADN de estos pacientes para confirmar que fuesen portadores de la mutación el análisis del pedigree y los fenotipos de estos pacientes fueron compatibles con el diagnóstico. Mutaciones adicionales en genes asociados al síndrome de QT largo (*KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2* y *SCN5A*) fueron descartadas en familiares de primer grado de estos pacientes. Los autores de este trabajo llaman la atención sobre la coexistencia de la muerte súbita en esta familia con GEFS + y mutación en *SCN1A* y sugieren la relación de este canal con ambos trastornos [Hindocha N et al, 2008].

¿Qué tipo de arritmias cardíacas se producen durante las crisis epilépticas?

Existen varios estudios dirigidos a la búsqueda de arritmias cardíacas sucedidas durante las crisis en pacientes epilépticos monitorizados en unidades de videoelectroencefalografía. Estos estudios muestran que las anomalías del electrocardiograma (ECG) durante las crisis son frecuentes pudiendo aparecer hasta en un 40% de los pacientes. En la mayoría de las crisis existe un aumento del ritmo cardíaco secundario a un estado hiperadrenergico, siendo la taquicardia sinusal la arritmia más comúnmente descrita. Generalmente se trata por lo tanto de arritmias benignas. Las arritmias cardíacas potencialmente graves son menos frecuentes (se estima que puedan aparecer en el 10% de los pacientes) e incluyen la bradicardia sinusal y la asistolia así como alteraciones del segmento ST y del intervalo QT [Opferk y col, 2002] [Standridge SM y col, 2010].

Las anomalías del ECG se asocian más frecuentemente con crisis generalizadas que con crisis focales. Sin embargo algunas arritmias potencialmente graves (la bradicardia sinusal y la asistolia) aparecen comúnmente asociadas a crisis parciales de origen temporal [Britton JW, 2006] [Schuele SU, 2007] [Winesett P, 2009] [Odier C, 2009] [Opherk C, 2002] .

En conjunto todas estas observaciones respaldan la hipótesis de que **arritmias cardiacas sucedidas durante las crisis puedan ser las responsables del aumento del riesgo de muerte súbita en la epilepsia.**

¿Qué tipo de arritmias cardiacas se asocian a muerte súbita?

Los dos síndromes más comúnmente asociados a muerte súbita de origen cardiaco son el **síndrome de QT largo** y el **síndrome de Brugada**. Ambos síndromes se caracterizan por patrones electrocardiográficos característicos asociados a síncope de repetición y a arritmias cardiacas malignas en ausencia de una cardiopatía estructural. Cada vez son más numerosos los trabajos publicados en los que se describen pacientes con crisis epilépticas y estos síndromes arritmogénicos; en algunas ocasiones el diagnostico erróneo de crisis epilépticas enmascara y retrasa la detección del síndrome, mientras que en otros casos hay una coincidencia de ambas patologías.

El síndrome de Brugada y el síndrome de QT largo forman parte de las canalopatías ya que se producen por alteraciones de los canales iónicos transmembrana implicados en el potencial de acción celular. Ambas entidades se han asociado a mutaciones en el gen codificante de la subunidad alfa-5 del canal de sodio (**SCN5A**) que se expresa en el músculo cardiaco.

El síndrome de QT largo se caracteriza por la presencia de un intervalo QT prolongado en el electrocardiograma ($QTc > 440ms$) junto con arritmias ventriculares polimorfas que dan lugar a síncope de repetición y muerte súbita. Este síndrome es genéticamente heterogéneo; se ha asociado a mutaciones en numerosos genes que codifican subunidades de canales iónicos de potasio, calcio y sodio (**KCNQ1**, **KCNH2**, **KCNE1**, **KCNE2**, **CACNA1c**, **CAV3**, **SCN5A**, **SCN4B**). La variante más frecuente (LQT1) es causada por mutaciones en el gen codificante para la subunidad Q1 del canal de potasio (**KCNQ1**). El tipo LQT3 es debido a mutaciones en el gen codificante para la subunidad alfa-5 del canal de sodio cardiaco localizado en el cromosoma 3 (3p21-24) [Wang Q y col, 1995]. Los estudios funcionales de mutaciones encontradas en este gen mostraron un defecto en la inactivación del canal lo que conduce a una despolarización mantenida y una prolongación del potencial de acción miocárdico que explicaría el

riesgo de arritmias [Wang DW y col, 1996].

El síndrome de Brugada se caracteriza por la presencia en el electrocardiograma de un segmento ST elevado en precordiales derechas (V1-V3) asociado a bloqueo de rama derecha y a arritmias ventriculares malignas [Brugada P y col, 1992]. La prevalencia estimada se sitúa en torno a 5/10.000 habitantes. El modo de herencia es autosómico dominante. El gen más importante hasta el momento relacionado con este síndrome es el gen codificante de la subunidad alfa-5 del canal de sodio cardíaco o *SCN5A* [Chen Q y col, 1998]. Los estudios funcionales de las mutaciones detectadas en este gen muestran de forma general una reducción de la corriente de sodio por diferentes mecanismos. El desequilibrio entre las corrientes positivas de entrada y salida en la fase 1 del potencial de acción miocárdico (predominio de la corriente de salida de K^+) da lugar a un fenómeno de repolarización que da explicación a la morfología del electrocardiograma y a las arritmias ventriculares características de este síndrome.

Mutaciones en este mismo gen (*SCN5A*) se han asociado a otros defectos de la conducción cardíaca como la enfermedad progresiva del sistema de conducción familiar o la enfermedad del seno.

Dos datos interesantes son la mayor prevalencia en varones y el aumento de las arritmias durante el sueño, lo que explica las muertes súbitas ocurridas durante la noche [Benito B y col, 2009]. Es importante recordar a este respecto que en la familia que estudiamos tres de los cuatro pacientes fallecidos eran varones y que en dos de ellos la muerte súbita sobrevino durante el sueño.

Con respecto a la aparición durante el sueño se sabe que el reposo y el sueño nocturno son situaciones en las que hay un aumento de la inervación vagal. El aumento de la acetilcolina (principal neurotransmisor mediador) disminuye la corriente de calcio lo que podría desequilibrar aún más las corrientes positivas de entrada a la célula y de esta forma favorecer la arritmogénesis.

Con respecto a la mayor expresividad del síndrome en varones se han propuesto dos explicaciones: la primera de ellas es que existen diferencias constitucionales en las corrientes iónicas entre ambos sexos; la segunda es que las hormonas sexuales pueden influir o modificar estas corrientes iónicas [Benito B y col, 2009].

Además, otro dato interesante, es la observación de que la fiebre actúa como factor desencadenante de arritmias en niños con síndrome de Brugada [Probst V y col, 2007]. Este hecho es debido a que la temperatura influye en las propiedades electrofisiológicas del canal pudiendo desencadenar las arritmias [Dumaine R y col,

1999].

Recientemente el grupo de Thomas EA ha estudiado la influencia de la temperatura en las propiedades electrofisiológicas del canal de sodio neuronal en células transfectadas de mamífero. Estos autores demostraron cómo el aumento de temperatura indujo una disminución del potencial umbral y un aumento de la tasa de apertura del canal. En este mismo trabajo estos autores utilizaron un programa de simulación por ordenador de un modelo de excitabilidad de células de hipocampo para predecir el efecto de los cambios producidos por el aumento de temperatura en la propagación del potencial de acción encontrando que los cambios apreciados en el estudio electrofisiológico conducen a un incremento de la excitabilidad neuronal que sea probablemente la explicación fisiopatológica de las crisis febriles [Thomas EA y col, 2009].

¿Por qué mutaciones en el canal de sodio neuronal podrían explicar la muerte súbita?

La coincidencia de muerte súbita y epilepsia en esta familia hizo sospechar desde un principio una transmisión conjunta así como la posibilidad de que la mutación encontrada en *SCN1A* pudiera ser la causante de ambos trastornos. Hasta el momento no se ha confirmado la asociación de muerte súbita con mutaciones en *SCN1A* ni se han descrito arritmias potencialmente malignas asociadas a mutaciones en este gen. Sin embargo, como hemos expuesto anteriormente, mutaciones en el gen homólogo expresado en miocardio (*SCN5A*) se han vinculado con síndromes arritmogénicos causantes de muerte súbita tales como el síndrome de Brugada y el síndrome de QT largo.

Recientemente el grupo de Maier y colaboradores han demostrado que la subunidad alfa-1 del canal de sodio neuronal se expresa también en el tejido cardíaco de ratones adultos. Esta subunidad se localiza en los túbulos transversos y según sugieren estos autores podría estar implicada en la transmisión de la señal eléctrica a los miocitos (en el acoplamiento entre el sistema de conducción y de contracción del músculo cardíaco). Además, esta misma subunidad del canal de sodio neuronal se encuentra en el nodo sinoauricular pudiendo estar implicada en el control del ritmo cardíaco [Maier SK, 2002] [Maier SK, 2003].

Ambos hechos; la asociación de un gen homólogo (*SCN5A*) con síndromes arritmogénicos malignos y la demostración de que la subunidad alfa-1 del canal de sodio neuronal se expresa también en tejido cardíaco fortalecen la idea de que mutaciones en *SCN1A* pudieran ser causantes de arritmias cardíacas malignas tipo

Brugada o QT largo en esta familia. En base a esta hipótesis se realizó un estudio cardiológico en 4 individuos afectos y 3 individuos sanos que sirvieron como controles. La evaluación cardiológica no mostró anomalías significativas en ninguno de los individuos estudiados. Sin embargo, a pesar de no disponer de una evidencia clínica y en ausencia de otros mecanismos etiopatogénicos, continuamos cuestionándonos la posibilidad de que la mutación en *SCN1A* genere arritmias ocultas que no han podido ser desenmascaradas por el estudio cardiológico y que explicarían los casos de muerte súbita en esta familia.

¿Por qué en concreto esta mutación y no otras mutaciones en SCN1A podría explicar un aumento del riesgo de muerte súbita en esta familia?

Una cuestión que surge irremediablemente es por qué la mutación concreta encontrada en esta familia podría implicar un riesgo aumentado de muerte súbita con respecto a otras mutaciones encontradas en familias con GEFS + sin muerte súbita. La repercusión funcional de la mutación N1735K es similar a la observada en otras mutaciones por lo que no es esta mutación en concreto ni el defecto funcional que ocasiona lo que explicaría el aumento de la muerte súbita.

Las explicaciones a esta cuestión podrían ser:

- * Por un lado que los casos de muerte súbita en familias con epilepsia generalizada con crisis febriles plus y mutaciones en *SCN1A* hayan pasado desapercibidos o no hayan sido correctamente diagnosticados. En este sentido es importante la detección de nuevos casos y estudiar bien la causa del fallecimiento de pacientes con GEFS + en otras familias.
- * Por otro lado el trasfondo genético y la presencia de genes que actúen como modificadores de la enfermedad podrían explicar el riesgo aumentado de muerte súbita en esta familia. En este sentido sería interesante el estudio de los genes *SCN5A* y *SCN3A* que codifican para el canal de sodio expresado en miocardio en busca de mutaciones o de alelos específicos que diferencien a esta familia del resto de la población y que podrían por lo tanto estar condicionando un mayor riesgo de muerte súbita.

Aspectos genéticos:

El análisis del pedigree mostró un modo de herencia autosómico dominante.

El análisis directo del gen *SCN1A* detectó la mutación C5205G en heterocigosis en 24 individuos de la familia de los cuales 21 expresaron la enfermedad mientras que 3 fueron asintomáticos (individuos III-19, III-20 y III-21). Esto demuestra la **penetrancia**

incompleta de este síndrome epiléptico, siendo en el caso de la familia que hemos estudiado del **87,5%**. Es interesante destacar que los tres portadores asintomáticos pertenecen a un mismo núcleo familiar lo que podría deberse a la existencia de genes y/o alelos protectores en estos individuos.

Todos los pacientes fueron portadores de la mutación a excepción del individuo III-3. Este individuo, considerado como una fenocopia, presentó un retraso mental grave secundario a un hipotiroidismo congénito junto con crisis generalizadas tónico-clónicas afebriles y ausencias atípicas. Las fenocopias no son infrecuentes en familias con GEFS +. La distinción clínica de estas fenocopias es complicada, debido a la gran heterogeneidad y variabilidad en la expresión clínica de este síndrome epiléptico.

La variación C5205G encontrada en esta familia **constituye una nueva mutación** en el gen codificante de la subunidad alfa-1 del canal de sodio neuronal (*SCN1A*). Esta mutación induce un cambio de aminoácido en la posición 1735 de la proteína. Este residuo es altamente conservado y se localiza a nivel del bucle extracelular entre el segmento S5 y S6 del IV dominio de la proteína. Esta región está implicada en la interacción de la subunidad alfa con las subunidades beta [Makita N, 1996] [Qu Y, 1999]. La mutación N1735K da lugar al cambio de un aminoácido sin carga (arginina) por un aminoácido cargado positivamente (lisina). El exceso de cargas positivas podría alterar la interacción entre la subunidad alfa-1 y las subunidades beta-1 lo que a su vez podría modificar la cinética del canal.

Los estudios funcionales realizados en familias con GEFS + y mutaciones en *SCN1A* han mostrado una amplia gama de efectos en la expresión y función del canal, dando lugar tanto condiciones de hiperexcitabilidad como de hipoexcitabilidad de la membrana neuronal. Incluso se ha demostrado que una misma mutación puede dar lugar simultáneamente a cambios de hipo e hiperfunción en la cinética del canal y por lo tanto a condiciones de hiper e hipoexcitabilidad. El estudio funcional de la mutación encontrada en esta familia fue desarrollado en el laboratorio del profesor H. Lerche. La mutación N1735K indujo una **disminución en la densidad de corriente de sodio** así como un **retraso en la recuperación de la fase de inactivación del canal** lo que da lugar a una pérdida de función del canal. Es difícil comprender cómo la hipofunción del canal de sodio da lugar a un estado de hiperexcitabilidad. Diversos autores argumentan que es la hipofunción de los sistemas inhibitorios la que induce secundariamente la hiperexcitabilidad neuronal subyacente a la epileptogénesis de la misma forma que podría inducir la hiperexcitabilidad miocárdica y ser el origen de arritmias

potencialmente malignas.

5.3 FAMILIA ED-HP

Aspectos clínicos

Fenotipo

El aspecto clínico más relevante en esta familia fue la coincidencia de dos trastornos que hasta el momento se conocían de forma independiente: la heterotopia nodular periventricular y el síndrome de Ehler-Danlos y la segregación de ambos fenotipos con una nueva mutación en el gen de la filamina-A. Hasta el momento, la asociación de ambos síndromes había sido tan solo observada en dos casos esporádicos y no existían casos familiares descritos. En 1981 el grupo de Cupo y col describió una mujer de 30 años afecta de un síndrome de Ehler-Danlos con hiperelasticidad cutánea y articular, enfermedad pulmonar progresiva secundaria a enfisema panacinar, aneurismas de los senos de Valsalva y crisis epilépticas. La paciente falleció a causa de una arritmia ventricular maligna y el estudio de autopsia reveló la presencia de una heterotopia nodular periventricular [Cupo *et al*, 1981]. Estos autores concluyeron que esta paciente presentaba una forma de Ehler-Danlos diferente a las diez variantes conocidas hasta entonces. Años más tarde, en 1996, el grupo de Thomas y colaboradores publicó el caso de una mujer de 24 años afecta de un síndrome de Ehlers-Danlos asociado a crisis focales sensitivo-motoras derechas. El síndrome de ED en esta paciente se caracterizaba por una piel hiperextensible, una hipermovilidad de las pequeñas articulaciones, dilatación de los senos de Valsalva y de la raíz aórtica. La imagen de RM cerebral mostró una HNP asociada a una megacisterna magna y a una agenesia parcial de la parte posterior del cuerpo calloso [Thomas *et al*, 1996]. Esta paciente tuvo dos embarazos de sexo masculino que resultaron en abortos. Los autores concluyeron que se trataba de un nuevo subtipo de ED asociado a una heterotopia nodular periventricular y una herencia dominante ligada al cromosoma X.

El síndrome de Ehler-Danlos se ha relacionado con otros tipos de malformaciones del desarrollo cortical. Una mujer de 22 años con un síndrome de ED tipo I y una epilepsia secundaria a una heterotopia focal asociada a una malformación vascular en la región silviana izquierda fue descrita por el grupo de Pretorius en 1983 [Pretorius ME *et al*, 1983]. También se han descrito dos pacientes con un síndrome de ED y una polimicrogiria bilateral [Echaniz-Laguna *et al*, 2000]. Ambas malformaciones constituyen en origen un trastorno de la migración neuronal.

Recientemente, coincidiendo con la realización de este trabajo, Sheen y col publicaron una serie de nueve casos esporádicos (incluyendo las dos pacientes previamente descritas por Cupo y Thomas) y dos familias con ED y HNP. Solo se encontraron mutaciones del gen *FLNA* en tres de los nueve casos esporádicos (ninguno de los descritos inicialmente por Cupo y Thomas). Estos son los primeros casos esporádicos con ambos fenotipos en los que se han demostrado mutaciones en el gen de la filamina. Estas mujeres presentaron hiperelasticidad cutánea, hiperlaxitud articular y malformaciones vasculares tales como aneurisma aórtico o cambios mixomatosos a nivel de las válvulas cardíacas. Una de las pacientes presentó además escoliosis, pectum excavatum, paladar ojival e hipoplasia mandibular, rasgos clínicos que recuerdan a la descripción de las mujeres afectas de nuestra familia. De las dos familias estudiadas por estos autores solo se encontró mutación en el gen *FLNA* en una de ellas [Sheen *et al*, 2005].

Esta es la segunda familia descrita afecta de ED y HNP con una herencia dominante ligada al cromosoma X y una mutación en el gen de la Filamina A.

Un nuevo subtipo de Ehler-Danlos

El síndrome de Ehlers-Danlos constituye un grupo de desórdenes del tejido conectivo que comparten rasgos comunes: hiperelasticidad cutánea, hipermovilidad articular y fragilidad tisular. Se han descrito 6 subtipos principales [Beighton *et al*, 1998].

Analizando en detalle las características clínicas de los diferentes subtipos de Ehlers-Danlos, observamos que el fenotipo de esta familia es distinto a las variantes clínicas descritas hasta el momento. La presencia de una piel hiperextensible y frágil junto con la formación de cicatrices atróficas/hipertróficas son características de las formas clásicas (ED tipo I y II). La hipermovilidad articular con tendencia a luxaciones de repetición (que constituye el rasgo clínico más representativo en la familia estudiada) es característica del síndrome de ED tipo III que es el que inicialmente se sugirió. Sin embargo, en este subtipo de ED no son típicas las anomalías viscerales (como la hernia inguinal bilateral, estenosis de píloro y hernia de hiato presentes en los individuos IV-1 y II-2 respectivamente) ni cardiovasculares (como el prolapso mitral y la hemorragia subaracnoidea observadas en el individuo II-2, más propias de la forma de ED tipo IV o vascular), ni gingivales (presentes en el individuo IV-1 y características de la variante periodontal o ED tipo VIII). Las anomalías esqueléticas observadas (escoliosis,

hiperlordosis lumbar, pectum excavatum) exceden también el cuadro clínico característico del síndrome de ED tipo III.

Tampoco la herencia dominante ligada al cromosoma X como se observa en esta familia es característica de ninguno de los subtipos del síndrome de ED descritos.

Por todo ello pensamos que se trata de un nuevo subtipo de ED.

Rasgos comunes con otros síndromes malformativos

Además del síndrome de Ehlers-Danlos en esta familia se observaron malformaciones craneofaciales de la línea media severas (labio leporino y paladar hendido en el individuo III-3, recién nacido que falleció a las pocas horas de vida) y leves (paladar ojival observado en los individuos IV 1 y III-2). Estas anomalías no están descritas en pacientes con síndrome de ED y se asemejan más al tipo de malformaciones descritas en otros síndromes malformativos congénitos tales como la displasia frontometafisaria y los síndromes otopalatodigitales (OPD). Estos síndromes constituyen displasias esqueléticas asociadas a un conjunto variable de malformaciones a nivel craneofacial y de otros órganos. Se han relacionado recientemente con mutaciones en el gen *FLNA* [Robertson *et al*, 2003], lo que convierte a estos síndromes y a la HNP en condiciones alélicas de un mismo trastorno genético. **La familia que presentamos en esta tesis presenta rasgos clínicos comunes y superponibles a ambas entidades.**

La heterotopia nodular periventricular no es un trastorno aislado de la migración neuronal

Por otro lado, la heterotopia nodular periventricular no constituye un trastorno aislado de la migración neuronal. Los pacientes afectados de HNP pueden asociar malformaciones menores a nivel del sistema nervioso central (disminución del tamaño del cuerpo calloso, megacisterna magna vs hipoplasia cerebelosa), trastornos cardiovasculares (ductus arterioso persistente, valvulopatía), hematológicos (coagulopatía) o anomalías esqueléticas craneofaciales de la línea media y de las extremidades (acortamiento digital, clinodactilia, sindactilia) [Fox *et al*, 1998] [Musumeci *et al*, 1997] [Slaney *et al*, 1999] [Zannolli *et al*, 2002] [Dobyns *et al*, 1997] [Guerrini *et al*, 1998]. Estas observaciones clínicas resultan por el momento escasas pero indicativas de que en muchos pacientes la HNP constituye un rasgo dentro de un

síndrome polimalformativo congénito afectando a múltiples tejidos y no solamente un trastorno aislado de la migración neuronal.

Por lo tanto, esta familia presenta un fenotipo solapado entre la HNP, el síndrome de Ehlers-Danlos y el espectro de síndromes otopalatodigitales.

Aspectos genéticos

El modo de herencia en esta familia fue compatible con una herencia dominante ligada al cromosoma X tal y como se observa en las familias afectas de HNP y mutaciones en el gen *FLNA*. El análisis mutacional de este gen permitió identificar una nueva mutación (p.Ala128Val) segregando con ambos fenotipos (HNP, ED). La mutación afecta a un residuo de alanina altamente conservado, situado en el primer dominio homólogo de la calponina (CHD 1) del dominio de unión a la actina o ABD, en el extremo amino-terminal de la proteína. Se han descrito en este dominio tres potenciales sitios de unión a la actina (ABS). Uno de ellos (ABS-2) es esencial para la unión a la actina [Van del Flier et al, 2001]. La mutación p.Ala128Val afecta a la secuencia estándar de reconocimiento del sitio ABS-2 lo que es esperable que altere la unión filamina-actina.

La interacción entre ambas proteínas es fundamental para el mantenimiento de la estructura y dinámica del citoesqueleto de actina [Stossel et al, 2001] [Vadlamudi et al, 2002] [Robertson et al, 2003]. Esto es a su vez esencial en los procesos de crecimiento, adhesión y migración celular implicados en la organogénesis. Esto explicaría cómo mutaciones en el gen de la filamina podrían asociarse a síndromes polimalformativos a nivel de múltiples órganos y tejidos incluyendo anomalías esqueléticas, viscerales, cardiovasculares y trastornos de la migración neuronal como la heterotopia nodular periventricular observada en esta familia.

Por otro lado el defecto en la interacción filamina-actina podría dar lugar a la formación de redes de actina anormalmente laxas. Así mismo la filamina mutada podría alterar la función de las integrinas en la adhesión de las células a la matriz extracelular confiriendo una elasticidad y fragilidad tisular excesivas lo que podría traducirse a nivel clínico en la hiperelasticidad cutánea e hipermovilidad articular observadas en los individuos afectos de esta familia y que condujeron al diagnóstico de un síndrome de Ehlers-Danlos.

Por todo ello pensamos que la mutación encontrada en la filamina es la responsable de la expresión simultánea del síndrome de Ehlers-Danlos y la HNP en esta familia.

Se desconoce cuales son los mecanismos moleculares que conllevan a la expresión clínica de ambos fenotipos en esta familia así como el mecanismo por el cual mutaciones en el gen de la filamina dan lugar a diferencias de fenotipo tan marcadas como las que existen entre la HNP y los síndromes OPD.

Una primera hipótesis es que **la expresión de un determinado fenotipo dependa del tipo y localización de la mutación**. Un ejemplo de ello es que la mayoría de mutaciones asociadas a HNP se localizan en el extremo amino-terminal de la proteína y producen una rotura de la proteína mientras que las mutaciones asociadas a los síndromes OPD presentan una distribución difusa a lo largo de la proteína y ocasionan mutaciones puntuales que pueden alterar parcialmente la función de la filamina sin producir una pérdida completa de su función. Es decir que diferentes mutaciones pueden ocasionar alteraciones funcionales distintas en la proteína y como consecuencia de ello, variaciones en el fenotipo. Por otro lado la filamina interacciona con múltiples proteínas de una gran diversidad funcional. La interacción con cada una de estas proteínas se establece en puntos concretos de la molécula, principalmente a nivel de su extremo carboxilo-terminal. De esta forma, mutaciones puntuales pueden interferir la unión de la filamina con determinadas proteínas y alterar de este modo funciones muy específicas dando lugar a signos/síntomas concretos. Por ejemplo, mutaciones que alterasen la interacción de la filamina con la glicoproteína Ib plaquetaria implicada en la adhesión de plaquetas al endotelio vascular dañado y en la activación de la cascada de coagulación podrían estar implicadas en trastornos de la coagulación en estos pacientes.

Una **segunda hipótesis** para explicar la combinación de fenotipos es que **la mutación encontrada en *FLNA* genere dos transcritos de ARNm diferentes y su traducción en dos proteínas anómalas distintas; una de ellas responsable de la HNP y otra responsable del fenotipo ED-síndromes OPD**. Es bien conocido que los genes de la filamina presentan procesamientos alternativos como resultado de la existencia de diversos promotores y regiones de poliadenilación y que estos procesamientos alternativos del ARN mensajero dan lugar a variantes de la proteína con cambios en sus propiedades funcionales. Como ejemplo, recientemente el grupo de Zenker publicó el caso de una mujer con una HNP asociada a una displasia

frontometafisaria en la que se identificó una mutación de novo en el gen de la filamina A. Esta mutación (L2439M) crea un sitio de *splicing* alternativo en el exón 45 del gen, dando lugar a la transcripción de dos proteínas funcionales aberrantes: una de longitud normal portadora del cambio de aminoácido y otra de longitud más corta debido a la pérdida de 21 pares de bases como resultado del *splicing* alternativo. Estos autores sugieren que la existencia de estas dos proteínas anómalas a partir de una sola mutación es la causa de combinación de ambos fenotipos [Zenker M et al, 2004], de forma similar a como podría suceder en nuestra familia. También recientemente se describió un varón afecto de heterotopia nodular periventricular asociada a rasgos dismórficos craneofaciales y estreñimiento severo en el que se identificó una mutación en un sitio de *splicing* en el exón 13 del gen de la filamina A. Esta mutación generaba dos transcritos de ARNm; uno de longitud completa y otro más corto con pérdida de la región 3' del exón 13. Los autores de esta publicación proponen que la existencia de estos dos transcritos es la responsable del nuevo fenotipo [Hehr et al, 2006].

Este hecho podría explicar la combinación de fenotipos observada en nuestra familia aunque en principio la mutación c.383C>T no afecta a ningún sitio conocido de *splicing*. De todas formas esta teoría resulta muy interesante, ya que aún no se conocen bien cuales son los procesamiento alternativos que sufre la Filamina A ni cuales son las consecuencias funcionales y clínicas de éstas variantes.

Por último, **la inactivación aleatoria del cromosoma X podría constituir un mecanismo epigenético modificador del fenotipo**. Las mujeres portadoras heterocigotas de mutaciones en el gen *FLN1A* presentan dos líneas neuronales: unas que expresan la mutación, no migran correctamente y se quedan en la región periventricular constituyendo los nódulos heterotópicos y otras expresando el alelo normal que migran hasta la corteza cerebral. Esto explica cómo se produce la HNP. La inactivación aleatoria del cromosoma X puede desequilibrarse bien a favor del alelo normal, bien a favor del alelo mutado, lo que puede modificar la expresión del fenotipo tanto en la severidad como en la expresión clínica en los diferentes órganos o tejidos. Como ejemplo de esto, recientemente se publicó el caso de una madre y una hija afectas de HNP. El fenotipo en la hija fue más grave como resultado de una inactivación preferencial (>80%) del cromosoma X normal [Tsuneda SS et al, 2008].

Una última cuestión que nos planteamos es cómo la HNP asociada a mutaciones del gen *FLN1A* puede generar epilepsia. En el momento actual no está claro cuales son los mecanismos que conducen a la epileptogénesis en la HNP.

Los estudios más recientes sugieren que el origen de las crisis está en una excitabilidad anormal tanto de las neuronas heterotópicas como de las neuronas corticales con las que establecen conexiones [Valton L et al, 2008] [Archer JS et al, 2010]

Se sabe además a través de estudios inmunocitoquímicos que la filamina se coexpresa con el canal de potasio dependiente de voltaje Kv4.2 a nivel de las espinas dendríticas, que modula su expresión en la membrana y la generación de corrientes a través del canal. La función principal de estos canales es regular la excitabilidad de la membrana celular y la transmisión postsináptica. De esta forma, el defecto en la interacción de la filamina con este canal podría dar lugar a alteraciones en la excitabilidad neuronal y conducir a una mayor susceptibilidad a la epilepsia.

En resumen:

- Se describe una nueva mutación (c.383C>T) en el gen de la Filamina A en una familia afecta de HNP y ED. La mutación segrega con ambos fenotipos, lo que sugiere que es la responsable de ambos trastornos.
- Esta asociación constituye una nueva entidad clínica caracterizada por un trastorno de la migración neuronal (HNP) y un síndrome polimalformativo con rasgos solapados entre el síndrome de ED y el espectro de síndromes otopalatodigitales.
- La mutación afecta al sitio de unión de la actina interfiriendo posiblemente en la interacción filamina-actina. Esta interacción es fundamental en el mantenimiento de la estructura y dinámica del citoesqueleto que es a su vez fundamental en los procesos de adhesión, motilidad celular y desarrollo embrionario de múltiples tejidos. El resultado de la pérdida y/o mal funcionamiento de la interacción entre ambas proteínas podría explicar de esta forma malformaciones a nivel de múltiples tejidos incluyendo el tejido conectivo (dando lugar a una elasticidad anormal de piel y articulaciones), tejido esquelético (anomalías del paladar, de la columna vertebral, esternón), anomalías cardiovasculares (valvulopatía), viscerales (hernias inguinales, estenosis de píloro) así como el trastorno de migración neuronal (HNP) que caracterizan el fenotipo particular de esta familia.

6. CONCLUSIONES

1. Se describe una **nueva forma de epilepsia mioclónica familiar (familia AAE) asociada a una variación del ADN mitocondrial**. Las **características de este síndrome epiléptico** son:

- Una edad de inicio variable, preferentemente en la adolescencia e inicio de la edad adulta
- Heterogeneidad clínica intrafamiliar
- Presencia de crisis versivas frontales, crisis generalizadas tónico-clónicas y mioclonías
- Frecuente evolución a estados epilepticos parciales, convulsivos y mioclónicos
- Marcada fotosensibilidad
- Refractariedad al tratamiento
- Electroencefalograma con anomalías epileptiformes focales (de predominio en áreas temporales y rolándicas) y generalizadas heterogéneas (ondas agudas, puntas, punta-onda y polipunta-onda)
- Presencia de síntomas asociados como trastornos psiquiátricos, retraso psicomotor, temblor postural, migrañas, alteraciones oculomotoras y sordera neurosensorial
- Pronóstico variable

Las características clínicas particulares en esta familia permiten sugerir que tanto la tendencia a presentar **estados epilepticos refractarios** como la **asociación de crisis parciales, mioclonias y fotosensibilidad** son rasgos clínicos que pueden orientar en epilepsia a la búsqueda de una enfermedad mitocondrial.

2. Se ha **identificado una nueva mutación** en el gen codificante de la subunidad alfa-1 del canal de sodio neuronal (*SCN1A*) en una extensa familia afecta de una epilepsia generalizada con crisis febriles plus o GEFS+ (**familia EIG-24**).

La **asociación** clínica de **muerte súbita y epilepsia** en esta familia hizo sospechar que la mutación encontrada en *SCN1A* pudiera ser la causante de ambos trastornos. Dado que la muerte súbita en epilepsia ha sido relacionada mayoritariamente con arritmias cardíacas y que mutaciones en el gen homólogo de *SCN1A* a nivel del miocardio (*SCN5A*) se han relacionado con síndromes arritmogénicos malignos, se

realizó un estudio cardiológico completo en esta familia. Sin embargo el estudio cardiológico no detectó alteraciones. Sugerimos que **mutaciones en *SCN1A* podrían estar implicadas en la muerte súbita en el síndrome de GEFS + y deberían por lo tanto ser consideradas como un factor de riesgo de muerte súbita en epilepsia.**

3. Se describe la **segregación conjunta de dos entidades clínicas consideradas independientes hasta el momento actual: la heterotopia nodular periventricular y el síndrome de Ehlers-Danlos (familia ED-HNP).** El estudio del fenotipo expresado en esta familia permitió identificar rasgos comunes entre la HNP, el síndrome de Ehlers-Danlos y el espectro de síndromes otopalatodigitales. Se trata por lo tanto de un síndrome polimalformativo intermedio entre estas entidades.

El estudio molecular permitió identificar una **nueva mutación en el gen de la filamina A (*FLNA*).** La asociación del fenotipo tan particular encontrado en esta familia con este gen permite conocer mejor el espectro funcional de la filamina. Como proteína de unión a la actina, está implicada en la reorganización del citoesqueleto y secundariamente en los procesos de adhesión, cambio de morfología y migración celular jugando un papel esencial en la organogénesis. La familia ED-HNP constituye un ejemplo clínico que permite atribuir a la alteración de la filamina el origen no solo del trastorno de la migración neuronal (heterotopia nodular periventricular) sino también de anomalías del tejido conjuntivo (Ehlers-Danlos) y de un amplio espectro de síndromes polimalformativos. Consideramos importante realizar en el futuro más estudios de correlación fenotipo-genotipo en mutaciones del gen *FLNA* así como estudios funcionales que permitan una mejor caracterización de las funciones de la filamina y de las repercusiones clínicas de sus mutaciones.

Este trabajo es un ejemplo de que la genética clínica y el estudio del fenotipo tienen una gran importancia en la investigación médica relacionada tanto con el descubrimiento de nuevas entidades clínicas como con la identificación de nuevos genes y con el reconocimiento de nuevas funciones en genes y proteínas ya conocidos.

7. BIBLIOGRAFIA

Abou-Khalil B, Ge Q, Desai R, Ryther R, Bazyk A, Bailey R, Haines JL, Sutcliffe JS, George AL Jr. Partial and generalized epilepsy with febrile seizures plus and a novel SCN1A mutation. *Neurology* 2001;57:2265-2272.

Archer JS, Abbott DF, Masterton RA, Palmer SM, Jackson GD. Functional MRI interactions between dysplastic nodules and overlying cortex in periventricular nodular heterotopia. *Epilepsy Behav* 2010;19:631-634.

Alekov A, Rahman MM, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro. *J Physiol* 2000;529: 533-539.

Alekov AK, Rahman MM, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H. Enhanced inactivation and acceleration of activation of the sodium channel associated with epilepsy in man. *Eur J Neurosci* 2001;13:2171-2176.

Aridon P, Marini C, Di Resta C, Brilli E, De Fusco M, Politi F, Parrini E, Manfredi I, Pisano T, Pruna D, Curia G, Cianchetti C, Pasqualetti M, Becchetti A, Guerrini R, Casari G. Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. *Am J Hum Genet* 2006;79:342-350.

Bataillard M, Chatzoglou E, Rumbach L, Sternberg D, Tournade A, Laforet P, Jardel C, Maissonobe T, Lombes A. Atypical MELAS syndrome associated with a new mitochondrial tRNA glutamine point mutation. *Neurology* 2001;56:405-407.

Baulac S, Gourfinkel-An I, Picard F, Rosenberg-Bourgin M, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, LeGuern E. A second locus for familial generalized epilepsy with febrile seizure plus maps to chromosome 2q21-q33. *Am J Hum Genet* 1999;65:1078-1085.

Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E. First genetic evidence of GABA (A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet* 2001;28: 46-48.

Baulac S, Picard F, Herman A, Feingold J, Genin E, Hirsch E, Prud'homme JF, Baulac M, Brice A, LeGuern E. Evidence for digenic inheritance in a family with both febrile convulsions and temporal lobe epilepsy implicating chromosomes 18qter and 1q25-q31. *Ann Neurol* 2001;49:786-792.

Beighton P, De Paepe A, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. *Am J Med Genet* 1998;77: 31-37.

Benbadis SR, Gerson WA, Harvey JH, Lüders HO. Photosensitive temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1996;46:1540-1542.

Benito B, Brugada J, Brugada R, Brugada P. Síndrome de Brugada. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:1297-1315.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*.2010;51:676-85.

Berkovic SF, Howell RA, Hay DA, Hopper JL. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol* 1998; 43:435-445.

Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, Gambardella A, Steinlein OK, Grinton BE, Dean JT, Bordo L, Hodgson BL, Yamamoto T, Mulley JC, Zara F, Scheffer IE. Benign familial neonatal-infantile seizures: characterization of a new sodium channelopathy. *Ann Neurol* 2004;55:550-557.

Binnie CD. Human and simian photosensitivity. Epileptic seizures and syndromes. London: John Libbey & Company, 1994:49-54.

Bonanni P, Malacarne M, Moro F, Veggiotti P, Buti D, Ferrari AR, Parrini E, Mei D, Volzone A, Zara F, Heron SE, Bordo L, Marini C, Guerrini R. Generalized epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+): clinical spectrum in seven Italian families unrelated to SCN1A, SCN1B and GABRG2 gene mutations. *Epilepsia* 2004;45:149-158.

Britton JW, Ghearing GR, Benarroch EE, Cascino GD. The ictal bradycardia syndrome: localization and lateralization. *Epilepsia* 2006;47:737-744.

Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol* 1992;20:1391-1396.

Canafoglia L, Franceschetti S, Antozzi C, Carrara F, Farina L, Granata T, Lamantea E, Savoardo M, Uziel G, Villani F, Zeviani M, Avanzini G. Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders. *Neurology* 2001;56:1340-1346.

Colosimo E, Gambardella A, Mantegazza M, Labate A, Rusconi R, Schiavon E, Annesi F, Cassulini RR, Carrideo S, Chifari R, Canevini MP, Canger R, Franceschetti S, Annesi G, Wanke E, Quattrone A. Electroclinical features of a family with simple febrile seizures and temporal lobe epilepsy associated with SCN1A loss-of-function mutation. *Epilepsia* 2007;48:1691-1706.

Combi R, Dalprà L, Ferini-Strambi L, Tenchini ML. Frontal lobe epilepsy and mutations of the corticotropin-releasing hormone gene. *Ann Neurol* 2005;58:899-904.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 1981;22:489-501.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 1989;30:389-399.

Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, Vanasse M, Saint-Hilaire JM, Carmant L, Verner A, Lu WY, Wang YT, Rouleau GA. Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2002;31:184-189.

Cossette P, Loukas A, Lafrenière RG, Rochefort D, Harvey-Girard E, Ragsdale DS, Dunn RJ, Rouleau GA. Functional characterization of the D188V mutation in neuronal voltage-gated sodium channel causing generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS). *Epilepsy Res* 2003;53:107-117.

Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 1998;18:53-55.

Chen Y, Lu J, Pan H, Zhang Y, Wu H, Xu K, Liu X, Jiang Y, Bao X, Yao Z, Ding K, Lo WH, Qiang B, Chan P, Shen Y, Wu X. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 2003;54:239-243.

Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;392:293-296.

Cupo LN, Pyeritz RE, Olson JL, McPhee SJ, Hutchins GM, McKusick VA. Ehlers-Danlos syndrome with abnormal collagen fibrils, sinus of Valsalva aneurysms, myocardial infarction, panacinar emphysema and cerebral heterotopias. *Am J Med* 1981;71:1051-1058.

De Fusco M, Becchetti A, Patrignani A, Annesi G, Gambardella A, Quattrone A, Ballabio A, Wanke E, Casari G. The nicotinic receptor beta-2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nature Genet* 2000;26: 275-276.

Dobyns WB, Guerrini R, Czapansky-Beilman DK, Pierpont ME, Brenningstall G, Yock DH Jr, Bonanni P, Truwit CL. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and syndactyly in boys: a new X-linked mental retardation syndrome. *Neurology* 1997;49:1042-1047.

Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Vatta M, Nesterenko DV, Nesterenko VV, Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C. Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ Res* 1999;85:803-809.

Echaniz-Laguna A, Saint-Martin A, Lafontaine AL, Tasch E, Thomas P, Hirsh E, Marescaux C, Andermann F. Bilateral focal polymicrogyria in Ehlers-Danlos syndrome. *Arch Neurol* 2000;57:123-127.

Engel J Jr. International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42:796-803.

Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH, Baulac S, Huberfeld G, An-Gourfinkel I, Brice A, LeGuern E, Moulard B, Chaigne D, Buresi C, Malafosse A. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 2000;24: 343-345.

Escayg AP, De Waard M, Lee DD, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T, Meisler MH. Coding and no coding variation of the human calcium-channel β -4 subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* 2000;66:1531-1539.

Escayg A, Heils A, MacDonald BT, Haug K, Sander T, Meisler MH. A novel SCN1A mutation associated with generalized epilepsy with febrile seizures plus and prevalence of variants in patients with epilepsy. *Am J Hum Genet* 2001;68:866-873.

European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993;75:1305-1315.

Ficker DM. Sudden unexplained death an injury in epilepsy. *Epilepsia* 2000;41 Suppl 2:S7-12.

Fiore LA, Valente K, Gronich G, Ono CR, Buchpiguél CA. Mesial temporal lobe epilepsy with focal photoparoxysmal response. *Epileptic Disord* 2003;5:39-43.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005;46:470-472.

Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998;21:1315-1325.

Godoy J, Lüders H, Dinner DS, Morris HH, Wyllie E. Versive eye movements elicited by cortical stimulation of the human brain. *Neurology* 1990;40:296-299.

Goto Y, Tojo M, Tohyama J, Horai S, Nonaka I. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA-Leu(UUR) gene in a family with mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1992;31:672-675.

Guerrini R, Dobyns WB. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and frontonasal malformation. *Neurology* 1998;51:499-503.

Guerrini R, Mei D, Sisodiya S, Sicca F, Harding B, Takahashi Y, Dorn T, Yoshida A, Campistol J, Krämer G, Moro F, Dobyns WB, Parrini E. Germline and mosaic mutations of FLN1 in men with periventricular heterotopia. *Neurology* 2004;63:51-56.

Hanna MG, Nelson IP, Morgan-Hughes JA, Wood NW. MELAS: a new disease associated mitochondrial DNA mutation and evidence for further genetic heterogeneity. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1998;65:512-517.

Harding GFA, Jeavons PM. Photosensitive epilepsy. Cambridge: MacKeith Press 1994:14-16.

- Hennessy MJ, Binnie CD. Photogenic partial seizures. *Epilepsia* 2000;41:59-64.
- Heron SE, Crossland KM, Andermann E, Phillips HA, Hall AJ, Bleasel A, Shevell M, Mercho S, Seni MH, Guiot MC, Mulley JC, Berkovic SF, Scheffer IE. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 2002;360:851-852.
- Herlenius E, Heron SE, Grinton BE, Keay D, Scheffer IE, Mulley JC, Berkovic SF. SCN2A mutations and benign familial neonatal-infantile seizures: the phenotypic spectrum. *Epilepsia* 2007;48:1138-1142.
- Hindocha N, Nashef L, Elmslie F, Birch R, Zuberi S, Al-Chalabi A, Crotti L, Schwartz PJ, Makoff A. Two cases of sudden unexpected death in epilepsy in a GEFS+ family with an SCN1A mutation. *Epilepsia* 2008;49:360-365.
- Imbrici P, Jaffe SL, Eunson LH, Davies NP, Herd C, Robertson R, Kullmann DM, Hanna MG. Dysfunction of the brain calcium channel CaV2.1 in absence epilepsy and episodic ataxia. *Brain* 2004;127:2682-2692.
- Isnard J, Guénot M, Fischer C, Mertens P, Sindou M, Mauguière F. A stereoelectroencephalographic (SEEG) study of light-induced mesiotemporal epileptic seizures. *Epilepsia* 1998;39:1098-1103.
- Jouveneau A, Eunson LH, Spauschus A, Ramesh V, Zuberi SM, Kullmann DM, Hanna MG. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet* 2001;358:801-807.
- Jou SH, Chiu NY, Liu CS. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Med J*;32:370-379.
- Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002;30:335-341.
- Kapucu LO, Gücüyener K, Vural G, Köse G, Tokçaer AB, Turgut B, Unlü M. Brain SPECT evaluation of patients with pure photosensitive epilepsy. *J Nucl Med* 1996;37:1755-1759.
- Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR, Taylor RW. Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2004;41:784-789.
- Kingston HM. Genetic Assessment and Pedigree Analysis. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR, eds. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 4th ed. London: Churchill Livingstone;2002.
- Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Shimoizumi H, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S. Respiration-deficient cells are caused by a single point mutation in

the mitochondrial tRNA-leu (UUR) gene in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS). *Am J Hum Genet* 1991;49:590-599.

Kobayashi E, Santos NF, Torres FR, Secolin R, Sardinha LA, Lopez-Cendes I, Cendes F. Magnetic resonance imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Arch Neurol* 2003;60:1546-1551.

Lee YM, Kang HC, Lee JS, Kim SH, Kim EY, Lee SK, Slama A, Kim HD. Mitochondrial respiratory chain defects: underlying etiology in various epileptic conditions. *Epilepsia* 2008;49:685-690.

Leeftang EP, Marsh SE, Parrini E, Moro F, Pilz D, Dobyns WB, Guerrini R, Wheless JW, Gleeson JG. Patient with bilateral periventricular nodular heterotopia and polymicrogyria with apparently balanced reciprocal translocation t(1;6)(p12;p12.2) that interrupts the mannosidase alpha, class 1A, and glutathione S-transferase A2 genes. *J Med Genet* 2003;40:e128.

Leestma JE, Annegers JF, Brodie MJ, Brown S, Schraeder P, Siscovick D, Wannamaker BB, Tennis PS, Cierpial MA, Earl NL. Sudden unexplained death in epilepsy: observations from a large clinical development program. *Epilepsia* 1997;38:47-55.

Lerche H, Weber YG, Baier H, Jurkat-Rott K, Kraus de Camargo O, Ludolph AC, Bode H, Lehmann-Horn F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: further heterogeneity in a large family. *Neurology* 2001;57:1191-1198.

Lhatoo SD, Johnson AL, Goodridge DM, MacDonald BK, Sander JW, Shorvon SD. Mortality in epilepsy in the first 11 to 14 years after diagnosis: multivariate analysis of a long-term, prospective, population-based cohort. *Ann Neurol* 2001;49:336-344.

Lossin C, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George AL Jr. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 2002;34:877-884.

Lossin C, Rhodes TH, Desai RR, Vanoye CG, Wang D, Carniciu S, Devinsky O, George AL Jr. Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *J Neurosci* 2003;23:11289-11295.

Mahoney K, Moore SJ, Buckley D, Alam M, Parfrey P, Penney S, Merner N, Hodgkinson K, Young TL. Variable neurologic phenotype in a GEFS + family with a novel mutation in SCN1A. *Seizure* 2009;18:492-497.

Maier SK, Westenbroek RE, Schenkman KA, Feigl EO, Scheuer T, Catterall WA. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:4073-4078.

Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA, Scheuer T. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:3507-3512.

Makita N, Bennett PB, George AL Jr. Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J Neurosci* 1996;16:7117-7127.

Malacarne M, Madia F, Gennaro E, Vacca D, Guney AI, Buono S, Bernardina BD, Gaggero R, Gobbi G, Lispi ML, Malamaci D, Melideo G, Roccella M, Sferro C, Tiberti A, Vanadia F, Vigeveno F, Viri F, Vitali MR, Bricarelli FD, Bianchi A, Zara F. Lack of SCN1A mutations in familial febrile seizures. *Epilepsia* 2002;43:559-562.

Maljevic S, Krampfl K, Cobilanschi J, Tilgen N, Beyer S, Weber YG, Schlesinger F, Ursu D, Melzer W, Cossette P, Buffer J, Lerche H, Heils A. A mutation in the GABA-A receptor alpha-1-subunit is associated with absence epilepsy. *Ann. Neurol* 2006;59:983-987.

Mancuso M, Filosto M, Mootha VK, Rocchi A, Pistolesi S, Murri L, DiMauro S, Siciliano G. A novel mitochondrial tRNA-phe mutation causes MERRF syndrome. *Neurology* 2004;62:2119-2121.

Martin MS, Tang B, Papale LA, Yu FH, Catterall WA, Escayg A. The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mol Genet* 2007;16:2892-2899.

McHugh JC, Delanty N. Epidemiology and classification of epilepsy: gender comparisons. *Int Rev Neurobiol* 2008;83:11-26.

Melone MAB, Tessa A, Petrini S, Lus G, Sampaolo S, di Fede G, Santorelli FM, Cotrufo R. Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERFF phenotype. *Arch. Neurol* 2004;61:269-272.

Menini C, Silva-Barrat C. The photosensitive epilepsy of the baboon. A model of generalised reflex epilepsy. *Adv Neurol* 1998;75:29-47.

Michelucci R, Poza JJ, Sofia V, de Feo MR, Binelli S, Bisulli F, Scudellaro E, Simionati B, Zimbello R, D'Orsi G, Passarelli D, Avoni P, Avanzini G, Tinuper P, Biondi R, Valle G, Mautner VF, Stephani U, Tassinari CA, Moschonas NK, Siebert R, Lopez de Munain A, Perez-Tur J, Nobile C. Autosomal dominant lateral temporal epilepsy: clinical spectrum, new epileptin mutations, and genetic heterogeneity in seven European families. *Epilepsia* 2003;44:1289-1297.

Mohanraj R, Norrie J, Stephen LJ, Kelly K, Hitiris N, Brodie MJ. Mortality in adults with newly diagnosed and chronic epilepsy: a retrospective comparative study. *Lancet Neurol* 2006;5:481-487.

Moulard B, Guipponi M, Chaigne D, Mouthon D, Buresi C, Malafosse A : Identification of a new locus for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) on chromosome 2q24-q33. *Am J Hum Genet* 1999;65:1396-1400.

Musumeci SA, Ferri R, Elia M, Scuderi C, Del Gracco S, Azan G, Stefanini MC. A new family with periventricular nodular heterotopia and peculiar dysmorphic features. A probable X-linked dominant trait. *Arch Neurol* 1997;54:61-64.

Naini AB, Lu J, Kaufmann P, Bernstein RA, Mancuso M, Bonilla E, Hirano M, DiMauro S. Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. *Arch Neurol*. 2005 Mar;62:473-476.

Nakamura M, Nakano S, Gato Y-i, Ozawa M, Nagahama Y, Fukuyama H, Akiguchi I, Kaji R, Kimura J. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA (ser(UCN)) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:86-93.

Nashef L, Walker F, Allen P, Sander JW, Shorvon SD, Fish DR. Apnoea and bradycardia during epileptic seizures: relation to sudden death in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60:297-300.

Nashef L, Brown S. Epilepsy and sudden death. *Lancet* 1996 Nov 16;348:1324-1325.

Nashef L, Garner S, Sander JW, Fish DR, Shorvon SD. Circumstances of death in sudden death in epilepsy: interviews of bereaved relatives. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:349-352.

Nilsson L, Farahmand BY, Persson PG, Thiblin I, Tomson T. Risk factors for sudden unexpected death in epilepsy: a case-control study. *Lancet* 1999;353:888-893.

Odier C, Nguyen DK, Bouthillier A, Giard N, Saint-Hilaire JM, Cossette P. Potentially life-threatening ictal bradycardia in intractable epilepsy. *Can J Neurol Sci* 2009;36:32-35.

Opherk C, Coromillas J, Hirsch LJ. Heart rate and EKG changes in 102 seizures: analysis of influencing factors. *Epilepsy Res* 2002;52:117-127.

Orita M, Iwahana H, Kanzawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-2770.

Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984;16:481-488.

Pretorius ME, Butler IJ. Neurologic manifestations of Ehlers-Danlos syndrome. *Neurology* 1983;33:1087-1089.

Probst V, Denjoy I, Meregalli PG, Amirault JC, Sacher F, Mansourati J, Babuty D, Villain E, Victor J, Schott JJ, Lupoglazoff JM, Mabo P, Veltmann C, Jesel L, Chevalier P, Clur SA, Haissaguerre M, Wolpert C, Le Marec H, Wilde AA. Clinical aspects and prognosis of Brugada syndrome in children. *Circulation* 2007;115:2042-2048.

Qu Y, Rogers JC, Chen SF, McCormick KA, Scheuer T, Catterall WA. Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel alpha subunit in voltage-dependent gating and modulation by beta-1 subunits. *J Biol Chem* 1999;274:32647-32654.

Ravn K, Wibrand F, Hansen FJ, Horn N, Rosenberg T, Schwartz M. An mtDNA mutation, 14453G-A, in the NADH dehydrogenase subunit 6 associated with severe MELAS syndrome. *Europ J Hum Genet* 2001;9:805-809.

Robertson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwright SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, Orstavik KH, Quarrell OW, Schwartz CE, Shears DJ, Suri M, Kendrick-Jones J, Wilkie AO; OPD-spectrum Disorders Clinical Collaborative Group. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 2003;33:487-491.

Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP, DiMauro S. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochem Biophys Res Comm* 1997;238:326-328.

Standridge SM, Holland KD, Horn PS. Cardiac arrhythmias and ictal events within an epilepsy monitoring unit. *Pediatr Neurol* 2010;42:201-205.

Scheffer IE and Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. *Brain* 1997;120:479-490.

Schuele SU, Bermeo AC, Alexopoulos AV, Locatelli ER, Burgess RC, Dinner DS, Foldvary-Schaefer N. Video-electrographic and clinical features in patients with ictal asystole. *Neurology* 2007;69:434-441.

Sheen VL, Dixon PH, Fox JW, Hong SE, Kinton L, Sisodiya SM, Duncan JS, Dubeau F, Scheffer IE, Schachter SC, Wilner A, Henchy R, Crino P, Kamuro K, DiMario F, Berg M, Kuzniecky R, Cole AJ, Bromfield E, Biber M, Schomer D, Wheless J, Silver K, Mochida GH, Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Dobyns WB, Wood NW, Walsh CA. Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Genet* 2001;10:1775-1783.

Sheen VL, Topcu M, Berkovic S, Yalnizoglu D, Blatt I, Bodell A, Hill RS, Ganesh VS, Cherry TJ, Shugart YY, Walsh CA. Autosomal recessive form of periventricular heterotopia. *Neurology* 2003;60:1108-1112.

Sheen VL, Wheless JW, Bodell A, Braverman E, Cotter PD, Rauen KA, Glenn O, Weisiger K, Packman S, Walsh CA, Sherr EH. Periventricular heterotopia associated with chromosome 5p anomalies. *Neurology* 2003;60:1033-1036.

Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, Grant PE, Shugart YY.; Imitola J, Khoury SJ, Guerrini R, Walsh CA. Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nature Genet* 2004;36:69-76.

Sheen VL, Jansen A, Chen MH, Parrini E, Morgan T, Ravenscroft R, Ganesh V, T. Underwood T, Wiley J, Leventer, Vaid RR, Ruiz DE, Hutchins GM, Menasha J, Willner J, Geng Y, Gripp KW, Nicholson L, Berry-Kravis E, Bodell A, Apse K, ScM, Hill RS, Dubeau F, Andermann F, Barkovich J, Andermann E, Shugart YY, Thomas P,

Viri M, Veggiotti P, Robertson S, Guerrini R, Walsh CA. Filamin A mutations cause periventricular heterotopia with Ehlers-Danlos syndrome. *Neurology* 2005;64:254-262.

Sheen VL, Walsh CA. Periventricular heterotopia: New insights into Ehlers-Danlos syndrome. *Clinical Medicine and Research* 2005;3:229-233.

Shoffner JM, Lott MT, Lezza AMS, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA-lys mutation. *Cell* 1990;61:931-937.

Singh R, Scheffer IE, Crossland K, Berkovic SF. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: a common childhood-onset genetic epilepsy syndrome. *Ann Neurol* 1999 45:75-81.

Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M. A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 1998;18:25-29.

Slaney SF, Chong WK, Winter RM. A new syndrome of short stature, distinctive facial features and periventricular grey matter heterotopia. *Clin Dysmorphol* 1999;8:5-9.

So N, Berkovic S, Andermann F, Kuziecky R, Gendron D, Quesney LF. Myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). Electrophysiological studies and comparison with other progressive myoclonus epilepsy. *Brain* 1989;112:1261-1276.

Spampanato J, Escayg A, Meisler MH, Goldin AL. Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *J Neurosci* 2001;21:7481-7490.

Spampanato J, Escayg A, Meisler MH, Goldin AL. Generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 mutation W1204R alters voltage-dependent gating of Na(v)1.1 sodium channels. *Neuroscience* 2003;116:37-48.

Stephani U, Tauer U, Koeleman B, Pinto D, Neubauer BA, Lindhout D. Genetics of Photosensitivity(Photoparoxysmal Response): A Review. *Epilepsia* 2004;45:19-23.

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet* 1995;11:201-203.

Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, Bonelli S, Assem-Hilger E, Leutmezer F, Schmied M, Hotzy C, Strom TM, Meitinger T, Zimprich F, Zimprich A. Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology* 2006;67:2029-2031.

Stossel TP, Condeelis J, cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:138-145.

Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M, Nagafuji H, Fukuma G, Mitsudome A, Wada K, Kaneko S, Hirose S, Yamakawa K. Nav1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology* 2001; 57 (4): 703-705.

Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, Guerrini R, Wuttke TV, Salvo-Vargas A, Deprez L, Claes LR, Jordanova A, Berkovic SF, Lerche H, De Jonghe P, Scheffer IE. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol* 2009;66:415-419.

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Medina MT, Takeuchi T, Morita R, Bai D, Ganesh S, Sugimoto Y, Inazawa J, Bailey JN, Ochoa A, Jara-Prado A, Rasmussen A, Ramos-Peek J, Cordova S, Rubio-Donnadieu F, Inoue Y, Osawa M, Kaneko S, Oguni H, Mori Y, Yamakawa K. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2004;36:842-849.

Tanaka M, Olsen RW, Medina MT, Schwartz E, Alonso ME, Duron RM, Castro-Ortega R, Martinez-Juarez IE, Pascual-Castroviejo I, Machado-Salas J, Silva R, Bailey JN, Bai D, Ochoa A, Jara-Prado A, Pineda G, Macdonald RL, Delgado-Escueta AV. Hyperglycosylation and reduced GABA currents of mutated GABRB3 polypeptide in remitting childhood absence epilepsy. *Am J Hum Genet* 2008;82:1249-1261.

Taylor RW, Schaefer AM, McDonnell MT, Petty RKH, Thomas AM, Blakely EL, Hayes CM, McFarland R, Turnbull DM. Catastrophic presentation of mitochondrial disease due to a mutation in the tRNA(his) gene. *Neurology* 2004;62:1420-1423.

Thomas EA, Hawkins RJ, Richards KL, Xu R, Gazina EV, Petrou S. Heat opens axon initial segment sodium channels: a febrile seizure mechanism? *Ann Neurol* 2009;66:219-226.

Thomas P, Bossan A, Lacour JP, Chanalet S, Ortonne JP, Chatel M. Ehlers-Danlos syndrome with subependymal periventricular heterotopias. *Neurology* 1996;46:1165-1167.

Tsuneda SS, Torres FR, Montenegro MA, Guerreiro MM, Cendes F, Lopes-Cendes I. A new missense mutation found in the FLNA gene in a family with bilateral periventricular nodular heterotopia (BPNH) alters the splicing process. *J Mol Neurosci* 2008;35:195-200.

Vadlamudi LK, Li F, Adam I, Nguyen D, Ohta Y, Stossel TP, Kumar R. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* 2002;4:681-690.

Valton L, Guye M, McGonigal A, Marquis P, Wendling F, Régis J, Chauvel P, Bartolomei F. Functional interactions in brain networks underlying epileptic seizures in bilateral diffuse periventricular heterotopia. *Clin Neurophysiol.* 2008 Jan;119:212-223.

Van der Flier A, Sonnerberg A. Structural and functional aspects of filamins. *BBA* 2001;1538:99-117.

Van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S and 29

others. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997;277:805-808.

Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nature genetics* 1998;19:366-70.

Wallace RH, Scheffer IE, Barnett S, Richards M, Dibbens L, Desai RR, Lerman-Sagie T, Lev D, Mazarib A, Brand N, Ben-Zeev B, Goikhman I, Singh R, Kremmidiotis G, Gardner A, Sutherland GR, George AL Jr, Mulley JC, Berkovic SF. Neuronal sodium-channel α 1-subunit mutations in generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Am J Hum Genet* 2001;68:859-865.

Wallace RH, Scheffer IE, Parasivam G, Barnett S, Wallace GB, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Generalized epilepsy with febrile seizures plus: mutation of the sodium channel subunit SCN1B. *Neurology* 2002;58:1426-1429.

Walczak TS, Leppik IE, D'Amelio M, Rarick J, So E, Ahman P, Ruggles K, Cascino GD, Annegers JF, Hauser WA. Incidence and risk factors in sudden unexpected death in epilepsy: a prospective cohort study. *Neurology* 2001;56:519-525.

Walsh CA, Cardenas P, Ji B, Duyk GM, Knoll J, Berg M, DiMario F, Huttenlocher P. Linkage of cerebral cortical periventricular heterotopia and epilepsy to markers in Xq28. *Neurology* 1995;45:A440.

Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;80:805-811.

Wang DW, Yazawa K, George AL Jr, Bennett PB. Characterization of human cardiac Na(+) channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93:13200-13205.

Wilkins AJ, Bonanni P, Porciatti V, Guerrini R. Physiology of Human Photosensitivity. *Epilepsia* 2004;45:7-13.

Winawer MR, Rabinowitz D, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R. Genetic influences on myoclonic and absence seizures. *Neurology* 2003;61:1576-1581.

Winesett P, Feliciano CA, Tatum WO 4th. Temporal lobe seizures triggering recurrent syncope by ictal asystole. *Epilepsy Behav* 2009;14:258-260.

Wong LJ, Yim D, Bai RK, Kwon H, Vacek MM, Zane J, Hoppel CL, Kerr DS. A novel mutation in the mitochondrial tRNA-ser(AGY) gene associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, and complex I deficiency. *J Med Genet* 2006;43:e46

Xu R, Thomas EA, Gazina EV, Richards KL, Quick M, Wallace RH, Harkin LA, Heron SE, Berkovic SF, Scheffer IE, Mulley JC, Petrou S. Generalized epilepsy with febrile seizures plus-associated sodium channel β 1 subunit mutations severely reduce β

subunit-mediated modulation of sodium channel function. *Neuroscience* 2007;148:164-174.

Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T, Tsuji S. A common mitochondrial DNA mutation in the tRNA-lys of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem Int* 1990;21:789-796.

Zannolli R, Conversano E, Serracca L, Di Bartolo RM, Molinelli M, Galluzzi P, Mazzei MA, Terrosi-Vagnoli P, Miracco C, De Santi MM, Vatti G, Coviello G, Malandrini A, Gonnelli S, Alessandrini C, Fimia M. Cortical periventricular heterotopia with ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet* 2002;113:385-389.

Zenker M, Rauch A, Winterpacht A, Tagariello A, Kraus C, Rupprecht T, Sticht H, Reis A. A dual phenotype of periventricular nodular heterotopia and frontometaphyseal dysplasia in one patient caused by a single FLNA mutation leading to two functionally different aberrant transcripts. *Am J Hum Genet* 2004;74:731-737.

Zeviani M, Muntoni F, Savarese N, Serra G, Tirante V, Carrara F, Mariotti C, DiDonato S. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA-lys gene. *Europ J Hum Genet* 1993;1:80-87.

8. ABREVIATURAS

ADTLE	Epilepsia lateral temporal autosómico dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
CIFB	Convulsiones infantiles familiares benignas
CGTC	Crisis generalizada tónico-clónica
CNFB	Convulsiones neonatales familiares benignas
COX	Citocromo Oxidasa
EAI	Epilepsia ausencia de la infancia
EAJ	Epilepsia ausencia de la juventud
ED	Ehlers-Danlos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
EIG	Epilepsia idiopática generalizada
ELI	Estimulación luminosa intermitente
EMJ	Epilepsia mioclónica juvenil
ENFAD	Epilepsia nocturna frontal autossómico dominante
FLNA/ <i>FLNA</i>	Filamina A/ <i>Gen codificante para la filamina A</i>
FMTLE	Epilepsia familiar temporal mesial
GABA	Acido gamma amino butírico
GABRG2	Subunidad gamma-2 del receptor GABA A
GEFS +	Epilepsia Generalizada con crisis febriles plus
HA	Esclerosis hipocampo
HNP	Heterotopia nodular periventricular
ILAE	International League Against Epilepsy
Kb	Kilobase o 10 ³ bases
LOD	Puntuación LOD
Mb	Megabase o 10 ³ bases
MELAS	Encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidentes cerebrovasculares
MERRF	Epilepsia mioclónica con fibras musculares rojo rasgadas
μl	Microlitro
pb	Pares de bases
OPD	Síndromes otopalatodigitales

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLPs	Polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de restricción
RM	Resonancia Magnética cerebral
SMEI	Epilepsia Mioclónica Severa de la Infancia
SSCA	Análisis de la conformación de ADN de cadena sencilla
TE	Tris-HCL/EDTA

9. PUBLICACIONES

- Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 1998;**21**:1315–25.
- 17 **Slaney SF**, Chong WK, Winter RM. A new syndrome of short stature, distinctive facial features and periventricular grey matter heterotopia. *Clin Dysmorphol* 1999;**8**:5–9.
 - 18 **Musumeci SA**, Ferri R, Elia M, Scuderi C, Del Gracco S, Azan G, Stefanini MC. A new family with periventricular nodular heterotopia and peculiar dysmorphic features. A probable X-linked dominant trait. *Arch Neurol* 1997;**54**:61–4.
 - 19 **Zannolli R**, Conversano E, Serracca L, Di Bartolo RM, Molinelli M, Galluzzi P, Mazzei MA, Terrosi-Vagnoli P, Miracco C, De Santi MM, Vatti G, Coviello G, Malandrini A, Gonnelli S, Alessandrini C, Fimia M. Cortical periventricular heterotopia with ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet* 2002;**113**:385–9.
 - 20 **Dobyns WB**, Guerrini R, Czupansky-Beilman DK, Pierpont ME, Breningstall G, Yock DH, Bonanni P, Truwit CL. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and syndactyly in boys: a new X-linked mental retardation syndrome. *Neurology* 1997;**49**:1042–7.
 - 21 **Guerrini R**, Dobyns WB. Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and frontonasal malformation. *Neurology* 1998;**51**:499–503.
 - 22 **Guerrini R**, Carrazzo R. Epileptogenic brain malformations: clinical presentation, malformative patterns and indications for genetic testing. *Seizure*. 2001;**10**: 532–43; quiz 544–7).
 - 23 **Vadlamudi LK**, Li F, Adam I, Nguyen D, Ohta Y, Stossel TP, Kumar R. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol* 2002;**4**:681–90.
 - 24 **Robertson SP**, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, Biancalana V, Gorlin RJ, Horn D, Kenwick SJ, Kim CA, Morava E, Newbury-Ecob R, Orstavik KH, Quarrell OW, Schwartz CE, Shears DJ, Suri M, Kendrick-Jones J, Wilkie AO, OPD-spectrum Disorders Clinical Collaborative Group. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Genet* 2003;**33**:487–91.
 - 25 **Van der Flier A**, Sonnerberg A. Structural and functional aspects of filamins. *BBA* 2001;**1538**:99–117.

bmjupdates+

bmjupdates+ is a unique and free alerting service, designed to keep you up to date with the medical literature that is truly important to your practice. bmjupdates+ will alert you to important new research and will provide you with the best new evidence concerning important advances in health care, tailored to your medical interests and time demands.

Where does the information come from?

bmjupdates+ applies an expert critical appraisal filter to over 100 top medical journals. A panel of over 2000 physicians find the few 'must read' studies for each area of clinical interest.

Sign up to receive your tailored email alerts, searching access and more...

www.bmjupdates.com